



Vasco Alberto Filipe Ribeiro

Licenciatura em Química Aplicada

Estudo do Papel do Ferro na Proteína Sensora de *Stress* Oxidativo - PerR

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Doutora Isabel Cristina da Costa Garcia Timóteo,
Investigadora Convidada, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Arguentes: Prof. Doutora Maria Cristina de Oliveira Costa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2014

Estudo do Papel do Ferro na Proteína Sensora de *Stress* Oxidativo - PerR

Copyright © Vasco Alberto Filipe Ribeiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Ao Ricardo,
À minha mãe.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Cristina Timóteo, por me ter dado a oportunidade de realizar a minha tese de mestrado num laboratório excecional, rodeado de pessoas cientificamente brilhantes e um ambiente extraordinário. O meu muito obrigado pelo seu apoio, dedicação e conselhos ao longo da realização deste trabalho. Um agradecimento também à FCT, MEC pelo financiamento da minha bolsa no âmbito do projeto EXPL/BBB-BQB/0354/2012, Um sensor de peróxido de hidrogénio numa bactéria anaeróbia: A PerR de *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*”

Aos Profs. Drs. Pedro Tavares e Alice Pereira, agradeço o acolhimento no seu laboratório, assim como todas as discussões em torno deste projeto que possibilitaram o seu avanço e verdadeiros “breakthroughs”.

Quero deixar um agradecimento especial à Prof. Dra. Alice Pereira pela forma sempre motivante com que me estimulou a continuar em frente, pelos seus conselhos, científicos e não só, determinantes para a minha evolução pessoal e profissional.

Agradeço à Daniela Penas pela sua disponibilidade em ajudar sempre que necessário, e ao fornecer alguns materiais essenciais à realização de algumas tarefas descritas neste trabalho. Quero também agradecer à Nídia Almeida, à Joana Macedo, à Inês Sofia, ao Filipe Folgosa e à Cristina Cordas pelo bom ambiente e momentos de descontração que foram um bem essencial ao longo deste ano.

Quero agradecer aos meus estimados amigos e colegas de faculdade, Sara Beijinho, David Soldado, David Sardinha e Alexandra Loupas, que apesar da alargada ausência ao longo deste ano contribuíram para me animar, apoiar e divertir. Um especial agradecimento ao meu amigo David Sardinha, que sempre me ouviu e aturou, e sempre me apoiou nas minhas decisões.

Um grande obrigado também ao Ricardo Pereira, à Susana Fialho, à Cátia Pereira e à pequena Leonor, pelos seus jantares de frango assado e má televisão de domingo, e ao nosso projeto no Teatro União, que me libertaram a cabeça das apoquentações.

À minha mãe e pelo seu incondicional apoio e preocupação, até mesmo quando lhe dizia que tudo corria pelo melhor.

E por fim ao meu Ricardo, que esteve sempre comigo nos risos e nos choros, que foi sempre o meu lar.

Resumo

As células anaeróbias possuem mecanismos de defesa face à exposição a oxigénio por forma a evitar a produção de espécies reativas de oxigénio que têm efeitos letais à célula. Esse é o exemplo a bactéria *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, que possui um conjunto de genes de destoxificação de espécies reativas de oxigénio regulado pela PerR – um sensor de peróxido de hidrogénio e regulador de transcrição.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da PerR de *D. vulgaris* com especial incidência no papel do ferro na resposta ao *stress* oxidativo, através de ensaios de ligação ao DNA e espectroscopias de EPR e Mössbauer.

A PerR é uma proteína de difícil expressão na forma solúvel, como tal desenvolveu-se um método de expressão e purificação da mesma através dos corpos de inclusão, por *on-column refolding* com uma proteína de fusão (His₆-SUMO-PerR), tendo-se obtido uma quantidade adequada de proteína pura para os ensaios pretendidos (1,62 µmol de proteína por 4 litros de crescimento).

Determinou-se pelos ensaios de ligação ao DNA que a His₆-SUMO-PerR protege o DNA da degradação por peróxido de hidrogénio e do corte com uma endonuclease quando incubada com ferro ferroso e com manganês, embora a proteína tenha uma maior afinidade pelo ferro. Por outro lado a proteína não apresenta afinidade pelo DNA quando incubada com cobre (II) ou com ferro férrico.

Por EPR de cobre incubado com His₆-SUMO-PerR confirmou-se que o centro regulatório da proteína é constituído por 3 histidinas, de acordo com o modelo proposto

A espectroscopia de Mössbauer permitiu compreender que a incubação da His₆-SUMO-PerR com o metal estrutural (zinco) antes do metal regulatório (⁵⁷Fe), é de extrema importância, dado que o contrário gera uma heterogeneidade de conformações. Determinou-se que a esta proteína tem um doublet com um desvio isomérico de 1,55 mm/s e um desdobramento de quadropolo de 2,34 mm/s.

Abstract

The anaerobic cells possess defence mechanisms against exposure to oxygen in order to avoid the production of reactive oxygen species, which are lethal to the cell. This is the example of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough bacteria, which has a set of genes that have the role of the detoxification of reactive oxygen species. These genes are regulated by PerR - a sensor of hydrogen peroxide and a transcription regulator.

The aim of this work was to study the *D. vulgaris* PerR with special orientation to the role of the iron in response to oxidative stress, through DNA binding assays and EPR and Mössbauer spectroscopy.

The PerR is a difficult protein to obtain in soluble form, as such we developed a method of expression and purification by on-column refolding of inclusion bodies, with a fusion protein (His₆-SUMO-PerR), yielding an adequate amount of pure protein to the desired tests (1.62 μmol of protein per 4 litres of growth medium).

The DNA binding assay with His₆-SUMO-PerR revealed that this fusion protein protects the DNA from degradation by hydrogen peroxide and from an endonuclease when incubated with ferrous iron and manganese, although the protein has a higher affinity for iron. Furthermore the protein has no affinity for DNA when incubated with copper (II) or ferric iron.

By EPR spectroscopy of copper incubated with His₆-SUMO-PerR, it was confirmed that the regulatory centre of the protein comprises three histidines, according to the proposed model

The Mössbauer spectroscopy allowed to understand that incubation of His₆-SUMO-PerR with its structural metal (zinc) before the regulatory metal (⁵⁷Fe), is extremely significant, since otherwise it generates a heterogeneity of conformations. It was determined that this protein has a doublet with an isomeric shift of 1.55 mm/s and a quadrupole split of 2.34 mm/s.

Lista de Abreviaturas

2xYT	"2x Yeast extract and Tryptone"
<i>ahpC</i>	"Alkyl hydro-peroxide reductase subunit C"
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	"Bicinchoninic Acid Assay"
<i>bfr</i>	"Bacterioferritin"
BSPerR	PerR de <i>B. subtilis</i>
DNA	"Deoxyribonucleic acid"
<i>D. vulgaris</i>	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>
DVPerR	PerR de <i>D. vulgaris</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EPR	"Electron paramagnetic resonance"
FPLC	"Fast protein liquid chromatography"
GFP	"Green fluorescent protein"
IB	"Inclusion Bodies"
ICP-AES	"Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy"
IMAC	"Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography"
IMAC	"Immobilized metal ion affinity chromatography"
IPTG	"Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside"
LacI	"Lactose inducibility"
LB	"Lysogeny Broth"
MOPS	"3-(N-morpholino)propanesulfonic acid"
<i>ngr</i>	"Nigerythrin"
pb	Pares de bases
pDNA	DNA plasmídico
PerR	"Peroxide Regulon Repressor"
PMSF	"Phenylmethanesulfonyl fluoride"
<i>rbr</i>	"Rubrerythrin"
RNA	"Ribonucleic acid"
Rop	"Repressor of Primer"
SRB	"Sulfate-reducing bacteria"
SUMO	"Small ubiquitin like modifier"
<i>tpx</i>	"Thiol-peroxidase"
ULP1	"Ubiquitin-like-specific protease 1"

Índice

Capítulo 1. Objetivos	1
Capítulo 2. Introdução.....	3
2.1 As Bactérias Redutoras de Sulfato	3
2.2 Stress Oxidativo.....	4
2.3 Sensores de stress oxidativo.....	6
2.4 A PerR de <i>Bacillus subtilis</i>	7
2.4.1 A superfamília FUR – “Ferric Uptake Regulator”	7
2.4.2 PerR: sequência e cofatores.....	8
2.4.3 Regulação da transcrição de genes	9
2.4.4 Propriedades espectroscópicas	14
Bibliografia	17
Capítulo 3. Expressão e purificação da PerR de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> Hildenborough21	21
3.1 O vetor de expressão pET28a_SUMO_PerR.....	21
3.2 Transformação de células competentes.....	24
3.3 Sobre-expressão, preparação do extrato celular e purificação	26
3.3.1 Testes de Sobre-expressão.....	27
3.3.2 Solubilização e purificação da proteína a partir de corpos de inclusão.....	37
3.4 Quantificação.....	45
3.5 Protocolo de purificação e <i>refolding</i> alternativo com EDTA	47
3.6 Conclusão.....	50
Bibliografia	51
Capítulo 4. Expressão e purificação de ULP1 e ensaios de hidrólise da cauda de SUMO	53
4.1 Expressão de ULP1	53
4.2 Purificação de ULP1 por Cromatografia de afinidade (IMAC).....	55
4.3 Ensaios de hidrólise da cauda N-terminal de proteína SUMO	57
4.4 Conclusão.....	61
Capítulo 5. Ensaios de ligação ao DNA	63
5.1 Planificação do ensaio e DNA utilizado.....	63
5.2 Extração de pUC19_ahpc e hidrólise com a endonuclease Tfi I.....	65
5.3 Metais presentes na proteína	68
5.4 Efeito da força iónica no ensaio de ligação da PerR ao DNA.....	68
5.5 Ensaios de ligação da PerR ao DNA na presença de ferro.....	70
5.5.1 Controlos de DNA sem adição de PerR na presença de metais e peróxido de hidrogénio	70
5.5.2 Ligação da PerR ao DNA reconstituída com excesso de Fe (II)	71
5.5.3 Ligação da PerR ao DNA reconstituída com Fe (II) numa relação estequiométrica	72
5.5.4 Ligação ao DNA da PerR reconstituída com excesso de Fe (III).....	74
5.6 Ensaios de ligação da PerR ao DNA na presença de manganês	76
5.6.1 Ligação ao DNA da PerR reconstituída com manganês (II) em excesso	76
5.6.2 Ligação ao DNA da PerR reconstituída com manganês (II) numa relação estequiométrica	78
5.7 Ensaio de ligação da PerR ao DNA na presença de cobre.....	79
5.8 Ensaio de ligação ao DNA da PerR purificada com EDTA e reconstituída Fe (II)	80
5.9 Conclusão.....	81

Bibliografia	82
Capítulo 6. Espectroscopia de EPR.....	83
6.1 Caracterização da PerR incubada Mn (II) ou Cu (II)	83
6.1.1 Caracterização da His ₆ -SUMO-PerR incubada com Mn (II).....	85
Cálculo da concentração de <i>spin</i>	86
6.1.2 His ₆ -SUMO-PerR incubada com cobre	87
Cálculo da concentração de <i>spin</i>	91
6.2 Conclusão.....	91
Bibliografia	92
Capítulo 7. Mössbauer	93
7.1 Condições experimentais e amostras.....	93
7.2 Espectros obtidos e simulações	94
7.3 Conclusão.....	97
Bibliografia	98
Capítulo 8. Conclusão	99
Capítulo 9. Trabalho futuro	101

Índice de Apêndices

Apêndice 1. Instrumentação.....	103
1.1. Balanças	103
1.2. Centrifugação	103
1.3. Diálises e concentração de proteína	103
1.4. Disrupção celular	103
1.5. Esterilização	103
1.6. Eléctrodo de pH	103
1.7. Electroforeses.....	103
1.8. Espectrómetro de EPR	104
1.9. Espectrómetro de Mössbauer	104
1.10. Espectrofotómetros	104
1.11. Filtração	104
1.12. Incubadoras.....	104
1.13. Purificação por IMAC	104
1.14. Transiluminadores e câmara	104
Apêndice 2. Antibióticos, Meios de Cultura.....	105
2.1. Antibióticos.....	105
2.2. Meio Lysogeny Broth (LB).....	105
2.3. Meio 2x Yeast extract and Tryptone (2xYT).....	105
Apêndice 3. Protocolos de transformação e extração de DNA	106
3.1. Transformação de células competentes <i>E. coli</i> DHY5a e BL21 (NZYTech)	106
3.2. Isolamento de DNA plasmídico NZYMidiprep (NZYTech)	106
Apêndice 4. Protocolo de Sobre-Expressão e Purificação de His₆-SUMO-PerR.....	108
4.1. Sobre-expressão em BL21(DE3)	108
4.2. Purificação da proteína His ₆ -SUMO-PerR por <i>refolding</i> em coluna com resina <i>His-Trap</i> <i>GE Healthcare</i>	108
Apêndice 5. Protocolo de Sobre-Expressão de ULP1	110
Apêndice 6. Eletroforeses.....	111
6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	111
6.2. Electroforese em gel de agarose.....	114
6.2.1. Preparação do gel.....	114
6.2.2. Aplicação das amostras.....	114
Apêndice 7. Hidrólise do vetor de pUC19_ahpc	116
Apêndice 8. Sequência da proteína de fusão His₆-SUMO-PerR	117
Apêndice 9. Quantificação de proteína por BCA	118
Apêndice 10. ICP	119
Apêndice 11. Ensaio de ligação na presença de zinco	122

Índice de Figuras

- Figura 2.1** – Alinhamento da sequência de aminoácidos realizado nos programas ClustalO e ESPrpt [30 – 32], da PerR de *D. vulgaris* (Q726L2) com proteínas homólogas identificadas por Blast na UniprotKB [33]: Fur de *D. desulfuricans* (Q30V29), PerR de *D. piger* (B6WSJ4), PerR de *Bilophila* (*Bp.*) *wadsworthia* (E5Y8E7) e PerR de *B. subtilis* (P71086). Os resíduos conservados envolvidos na ligação ao metal regulatório estão marcados com uma seta; as cisteínas responsáveis pela ligação ao zinco, com papel estrutural de dimerização, estão marcados com um asterisco. Com bolas estão marcados os resíduos de um putativo terceiro local de coordenação a metais. 8
- Figura 2.2** – Representação dos cofactores da BSPerR e dos aminoácidos que os coordenam. A. Local regulatório de ligação ao ferro ou ao manganês. B. Local estrutural de ligação ao zinco. Numeração das cadeias laterais dos resíduos corresponde à BSPerR. 9
- Figura 2.3** – Sequência palindrômica de DNA *consensus* de reconhecimento da BSPerR – PerR*box*. A letra “N” representa um qualquer nucleótido e a letra “t” indica que existe probabilidade de haver substituição desta timina por outro nucleótido. 9
- Figura 2.4** – Representação *cartoon* gerada no PyMol da BSPerR-Zn-Apo (PDB ID 2FE3) – conformação aberta. A – A azul e a vermelho estão representados o N-terminal de cada monómero; a verde e a laranja o C-terminal de cada monómero. B – Representação da zona onde o zinco se coordenada a 4 cisteínas. 10
- Figura 2.5** – Representação *cartoon* gerada no PyMol¹² da BSPerR-Zn-Mn (PDB ID 3F8N) – conformação fechada. A – Aspeto geral da proteína na conformação ativa; B – Pormenor da coordenação do manganês na BSPerR. 11
- Figura 2.6** – Mecanismo de oxidação da histidina 37 ou 91 com o anião radical hidroxilo proveniente de uma reação de Fenton entre H₂O₂ e Fe (II). Obtém-se no final a 2-oxo-histidina que apresenta tautomerismo ceto-enol. 12
- Figura 2.7** – Ilustração do modo de ação proposto da PerR na regulação genética. Na presença de ferro a PerR tem afinidade para a perR box DNA impedindo a transcrição genética. Após oxidação por H₂O₂ a proteína liberta o DNA, podendo seguir para degradação [38]. 12
- Figura 2.9** – Alinhamento de parte da sequência de aminoácidos preparada com ClustalO e ESPrpt [30 – 32], da PerR e Fur de *B. subtilis* (P71086 e P54574 respetivamente) com a PerR e a Fur de *D. vulgaris* (Q726L2 e Q72DI7 respetivamente). Assinalado com a seta está o resíduo 104, aspartato na PerR e glutamato na Fur de cada organismo. 15

Figura 3.1 – Vetor de expressão pET28a_SUMO_PerR. Ori – origem de replicação; KanR – resistência à canamicina; rop – proteína repressora do <i>primer</i> ; LacI – repressor do operão <i>lac</i> ; T7 terminator – terminador da transcrição da polimerase T7. Entre as enzimas de restrição XhoI e NdeI está inserido o gene da proteína His ₆ -SUMO-PerR.....	22
Figura 3.2 – Esquema ilustrativo do procedimento usado para a obtenção de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a_SUMO_PerR. A – Transformação de células <i>E. Coli</i> NZY5α; B – Extração do DNA plasmídico amplificado a partir de colônias isoladas da placa obtida em A; C – Transformação de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3) com o pDNA extraído de fresco e preparação de inóculos a partir de colônias isoladas.	24
Figura 3.3 – Gel 0,8 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a100 V, marcador NZYDNA Ladder III, para verificação da integridade e pureza do DNA plasmídico pET28a_SUMO_PerR, extraído a partir de células de <i>E. Coli</i> NZy5α, com um kit Miniprep (NZYtech). Verifica-se que o plasmídeo extraído de dois clones (1 e 2 na figura) tem a mesma mobilidade eletroforética que o utilizado para a transformação de <i>E. coli</i> NZy5α (pDNA origem, na figura).....	25
Figura 3.4 – Esquema do protocolo utilizado para expressar proteína solúvel.	27
Figura 3.6 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora e 20 minutos a 120 V, com marcador LMW NZYTech, dos sedimentos (<i>pellets</i>) e sobrenadantes das centrifugações a baixa velocidade (10 000 xg) e alta velocidade (180 000 xg). A seta indica a zona onde se espera encontrar a banda correspondente à proteína de fusão PerR-SUMO.....	28
Figura 3.7 – Plano de purificação e corte da cauda de Histidinas da His ₆ -SUMO-PerR (o corte da cauda ficará, no entanto, reservado para o próximo capítulo).	30
Figura 3.10 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora e 20 minutos a 120 V, com marcador LMW NZYTech, das frações resultantes da separação por IMAC. A seta indica a zona da banda correspondente à proteína em estudo.	35
Figura 3.11 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora e 20 minutos a 120 V, com marcador LMW NZYTech, do <i>desalting</i> da fração 3 de HiTrap. A seta indica a zona da banda correspondente à proteína em estudo.....	35
Figura 3.12 – Diagrama de fluxo com os passos necessários à purificação de proteína proveniente de corpos de inclusão (IB).	37
Figura 3.13 – Esquema do protocolo utilizado para expressar proteína insolúvel.	37

- Figura 3.14** – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, das amostras retiradas no momento de indução (T0) e 3 horas após (T3). A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo. 38
- Figura 3.15** – Aspeto da suspensão celular, com uma ampliação de 100 x num microscópio ótico após: A – 0 ciclos de sonicação; B – 3 ciclos; C – 10 ciclos..... 39
- Figura 3.16** – Esquema do protocolo utilizado para isolar e solubilizar a His₆-SUMO-PerR a partir de corpos de inclusão. 40
- Figura 3.17** – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos sobrenadantes de cada isolamento feito. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo..... 40
- Figura 3.18** – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos *pellets* de cada centrifugação e sobrenadantes correspondente. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo. 41
- Figura 3.20** – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos *pellets* de cada centrifugação e sobrenadante da ultracentrifugação (injetado). Waste corresponde à fração que saiu durante os passos de injeção e lavagem. Os tubos dizem respeito às frações recolhidas após a cromatografia IMAC, e correspondem aos números presentes no cromatograma da figura 3.19. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo. 43
- Figura 3.21** – Espectro de UV-visível da His₆-SUMO-PerR antes e depois de concentrada em gel absorvente..... 45
- Figura 3.22** – Espectro de UV-visível da His₆-SUMO-PerR solubilizada a partir de corpos de inclusão e purificada numa coluna IMAC, em tampão 50 mM Kpi, 500 mM NaCl..... 46
- Figura 3.23** – Gráfico de coeficientes de extinção molar *versus* comprimento de onda da His₆-SUMO-PerR pura em tampão 50 mM Kpi, 500 mM NaCl..... 46
- Figura 3.25** – Gel SDS-PAGE 12 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos *pellets* (P.) de cada centrifugação e sobrenadantes (S. e Injetado) correspondente à ultracentrifugação. Os tubos dizem respeito às frações recolhidas após o processo. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína. 49
- Figura 4.1** – Esquema do procedimento de expressão de ULP1. A – Pré-inóculo (a partir de uma colónia isolada) e inóculo, efetuados em meio LB com canamicina; B – Inóculo em meio 2xYT com

canamicina e indução da expressão proteica à D.O._{600TO} de 0,8. Recolha das células por centrifugação, após 4 horas de incubação a 30°C. C – Lise celular por sonicação e centrifugação..... 54

Figura 4.3 –Amersham ECL Gel 12%(*GE Healthcare*) , corrido 1 hora a 160 V de confirmação da purificação de ULP1.Poços: Marcador LMW NZYTech. Sobrenadante – aplicado na coluna; *waste* – fração que saiu durante os passos de injeção e lavagem. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína..... 56

Figura 4.4 – Gel *pre-cast* NuPAGE® (*Novex*®) 4-12% da InvitrogenTM, corrido a 160 V durante 1 hora, das hidrólises 1 e 2 e respectivas densitometrias efetuadas no programa ImageJ (NIH). Marcador de pesos moleculares SeeBlue® (*Invitrogen*TM)...... 58

Figura 4.5 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 120 V, marcador SeeBlue® (*Invitrogen*TM), da His₆-SUMO-PerR antes e depois da hidrólise. Fração 1 e 2 corresponde a amostras não hidrolisadas e hidrólise 1 e 2, ao resultado das respectivas hidrólises. As setas indicam as zonas onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo..... 59

Figura 4.6 – Gel *pre-cast* NuPAGE® *Novex*® 4-12% (*Invitrogen*TM), marcador LMW (*NZYTech*), corrido a 160 V durante 1 hora, do resultado das reações de hidrólise 1 e 2. As setas indicam as zonas onde se encontra a banda correspondente às proteínas de interesse..... 60

Figura 5.1 – Vetor pUC19_ahpc, utilizado nos testes de ligação da PerR ao DNA. A sequência a vermelho corresponde ao promotor do gene *ahpC* inserido no vetor pUC19. 64

Figura 5.2 – Diagrama que explicita de forma simplificada os ensaios de ligação e períodos de incubação. A PerR é incubada 30 minutos com o metal regulatório, sendo uma fração testada com peróxido e outra sem. Ambas as frações são analisadas em gel de agarose após incubação com/sem Tfi I durante 60 minutos..... 65

Figura 5.3 – Gel 0,8 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V com marcador NZYDNA Ladder III. Verifica-se que o plasmídeo extraído dos clones 1 e 2 têm a mesma mobilidade eletroforética que o utilizado para a transformação..... 66

Figura 5.4 – Espectro UV-Visível do DNA do plasmídeo pUC19_ahpc diluído em água com 3 fatores de diluição diferentes..... 66

Figura 5.6 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V com marcador NZYDNA Ladder III. Em A encontra-se o controlo, de DNA sem adição de PerR em tampão com 200 mM em NaCl força iónica. De B a G encontram-se ensaios de ligação com variação da concentração de NaCl, entre 30 e 200 mM que se correlacionam com as densitometrias. 69

Figura 5.7 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V com marcador NZYDNA Ladder III, do pUC19_ahpc antes e depois da hidrólise com Tfi I (poços 2 e 3, respectivamente), assim como o estado do DNA na presença de Fe(II) ou Mn(II) e peróxido de hidrogénio (poços 4 e 5, respectivamente).....	70
Figura 5.8 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V, com marcador NZYDNA Ladder III. Ensaio de ligação na presença de ferro em excesso (10 x), na presença e ausência de peróxido.....	71
Figura 5.9 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de Fe (II) 1:1, na presença e ausência de peróxido de hidrogénio.....	72
Figura 5.10 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de ferro férrico 1:10.....	74
Figura 5.12 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de manganês 1:1.....	78
Figura 5.13 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de cobre 1:20.....	79
Figura 5.14 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de zinco em excesso e ferro 1:1.....	80
Figura 6.1 – Espectros de EPR da PerR incubada com Mn (II) (Mn (II) PerR), do controlo de MnCl ₂ dissolvido no mesmo tampão (Mn (II) Tampão), PerR sem adição de Mn (II) (PerR) e tampão. Marcado com (□) estão os 6 sinais hiperfinos típicos do Mn (II) e a (*) as transições proibidas. Condições experimentais: 80 K; frequência de micro-onda, 9,45 GHz; potência da micro-onda, 200 mW; modulação da amplitude, 500 mG; ganho, 200.....	85
Figura 6.2 – Primeiro (A) e segundo (B) integral do espectro de EPR do manganês em proteína.....	87
Figura 6.3 – Espectros de EPR obtidos para o cobre em tampão (Cu (II) tampão) e incubado na proteína (Cu (II) PerR). Condições experimentais: 80 K; frequência de micro-onda, 9,45 GHz; potência da micro-onda, 200 mW; modulação da amplitude, 2000 mG; ganho, 200.....	87
Figura 6.4 – Pormenor dos desdobramentos hiperfinos provocados pela interacção com os núcleos de 3 azotos, na zona entre campo 3199 G e 3399 G do espectro de EPR da PerR incubada com Cu (II).	88
Figura 6.5 – Desdobramentos hiperfinos provocados por três núcleos $I = 1$ e respetivas intensidades relativas, para valores de A constantes.....	89

Figura 6.6 – Espectro de EPR experimental da PerR de *D. vulgaris* incubada com Cu(II), sobreposto à sua simulação segundo o modelo proposto e pormenor do modelo proposto aplicado na simulação. 89

Figura 6.7 – Primeiro (A) e segundo (B) integral do espectro de EPR do cobre em proteína.91

Figura 7.1 – Espectros de Mössbauer das amostras: A – Tampão + 840 μM ^{57}Fe (II); B – His₆-SUMO-PerR incubada com ^{57}Fe (II); C – His₆-SUMO-PerR incubada primeiro com ^{57}Fe (II) e depois com Zn (II); D – His₆-SUMO-PerR incubada primeiro com Zn (II) e depois com ^{57}Fe (II). 94

Figura 7.2 – Espectro de Mössbauer obtido da His₆-SUMO-PerR purificada com EDTA, incubada com excesso de Zn (II) e 1:1 com ^{57}Fe (II). 96

Índice de Figuras dos Apêndices

Figura 6.1 – Marcador de pesos moleculares <i>LMW</i>	112
Figura 6.2 – Marcador de pesos moleculares <i>Marker II</i> da <i>NZYTech</i>	112
Figura 6.3 – Marcador de pesos moleculares <i>SeeBlue®</i> da <i>Invitrogen</i>	112
Figura 6.4 – Marcador de pesos moleculares dos <i>NZYDNA Ladder III</i>	113
Figura 9.1 – Curva de calibração obtida pelo método de BCA fornecido.	117
Figura 11.1 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaios de ligação na presença de ferro e zinco 1:1 com proteína, na presença e ausência de peróxido.	121

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Proteínas envolvidas na defesa contra o <i>stress</i> oxidativo reguladas pela PerR em <i>D. vulgaris</i>	5
Tabela 2.2 – Proteínas pertencentes à superfamília FUR e os seus metais regulatórios.	7
Tabela 2.3 – Absorvância dos aminoácidos aromáticos em água e a pH neutro. Nas últimas colunas apresentam-se quantos aminoácidos de cada estão presentes na PerR.....	14
Tabela 2.4 – Parâmetros de Mössbauer para a BSPerR e BSPerR-D104E.	15
Tabela 5.1 – Cálculo da concentração de pUC19_ahpc.	66
Tabela 6.1 – Parâmetros de EPR calculados através da simulação do espectro experimental da PerR de <i>D. vulgaris</i> incubada com Cu (II).	90
Tabela 7.1 – Descrição das amostras realizadas para espectroscopia de Mössbauer.	93
Tabela 7.2 – Parâmetros hiperfinos calculados através das simulações dos espectros experimentais das amostras de His ₆ -SUMO-PerR incubadas com diferentes metais e do controlo de ⁵⁷ Fe (II). .	95

Índice de Tabelas dos Apêndices

Tabela 2.1 – Concentração dos antibióticos utilizados.....	105
Tabela 2.2 – Meio LB e a sua composição.....	105
Tabela 2.3 – Meio 2xYT e a sua composição.....	105
Tabela 6.1 – Soluções utilizadas em SDS-PAGE.....	110
Tabela 6.2 – Volume de amostra e de SB a aplicar no gel.	111
Tabela 6.3 – Volume das soluções necessárias à preparação dos géis de poliacrilamida.	111
Tabela 6.4 – Soluções corante e descolorante para os géis SDS-PAGE.	112
Tabela 6.5 – Lista de reagentes e materiais.	114
Tabela 7.1 – Tabela com os volumes de componentes a adicionar para se proceder à hidrólise.	115

Capítulo 1. Objetivos

O objetivo do presente trabalho é expressar e purificar a proteína PerR de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough e estudar a função desta proteína na presença dos seus metais regulatórios, com especial atenção ao ferro. Diversos ensaios foram planeados para cumprir este objetivo, nomeadamente: ligação a DNA, espectroscopia de EPR e espectroscopia de Mössbauer.

Capítulo 2. Introdução

2.1 As Bactérias Redutoras de Sulfato

As bactérias redutoras de sulfato (SRB), são procariontes anaeróbios que se encontram uniformemente distribuídas pela natureza. Estas bactérias geram energia por transferência eletrónica acoplada à fosforilação oxidativa, utilizando para isso o sulfato (ou tiosulfato), como aceitador final de eletrões originários da oxidação de hidrogénio molecular ou de ácidos orgânicos provenientes de fonte externa ou produzidos no citoplasma.

A redução de sulfato leva à produção de gás sulfídrico (ou ácido sulfídrico em solução aquosa), estando assim as SRB envolvidas nos ciclos do enxofre e do carbono. Esta sobreposição dos ciclos de carbono e enxofre é possibilitada pela sinergia de consórcios microbianos, em que alguns microrganismos fermentativos produzem hidrogénio e ácidos orgânicos pela decomposição de matéria orgânica. Estes consórcios onde as SRB se inserem são típicos de ambientes ricos em sulfato [1, 2].

A maior motivação para o estudo das SRB é o seu grande impacto económico devido à biocorrosão de ferro em ambientes anaeróbios, como é o caso de oleodutos e plataformas petrolíferas. No entanto o seu impacto económico pode representar aspetos positivos, pois as SRB conseguem precipitar metais tóxicos como cobre, níquel e cádmio na forma de sulfetos em ambientes acídicos. Além disso as SRB têm também a capacidade de doar diretamente eletrões a metais, como o urânio (VI), o tecnécio (VII) e o crómio (VI), reduzindo-os a uma forma menos solúvel, o que ajuda na descontaminação de efluentes [1, 3 – 6].

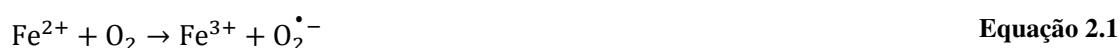
A bactéria *Desulfovibrio (D.) vulgaris* Hildenborough é considerada um organismo modelo para o estudo das SRB, tendo vindo a desenvolver-se diversos estudos respeitantes à forma como estas respondem a diversos tipos de *stress* ambiental, em especial o *stress* oxidativo [2, 7 – 12].

2.2 Stress Oxidativo

Os microrganismos podem ser denominados desde anaeróbios até aeróbios obrigatórios, passando por diversas classificações intermédias. No entanto, uma classificação de anaeróbio não implica ausência total de mecanismos de defesa face ao *stress* oxidativo.

Apesar da bactéria *D. vulgaris* ser considerada um organismo anaeróbio esta pode ser isolado a partir de uma grande diversidade de ambientes, incluindo alguns expostos periodicamente a quantidades variáveis de oxigénio. Surge então aqui uma questão chave: “o quão obrigatória é a anaerobiose?” [13].

O *stress* oxidativo pode ser resultante de diversos processos: o oxigénio é reduzido com um eletrão a superóxido ($O_2^{\bullet -}$), ou com dois eletrões, levando à produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2), representado na **Equação 2.1** e **Equação 2.2** respetivamente. No entanto os radicais hidroxilo ($\bullet OH$), formados, por exemplo, pela reação de Fenton (**Equação 2.3**), são os mais reativos e perigosos para a célula, visto não existirem mecanismos de eliminação deste radical.



A presença de espécies reativas de oxigénio na célula leva à degradação de proteínas, inativação de enzimas e danificação da bicamada lipídica e do DNA, comprometendo a viabilidade da célula. Para se protegerem, as células têm mecanismos de defesa: proteínas capazes de eliminar superóxido e peróxidos. Na bactéria *D. vulgaris* em particular, as proteínas com capacidade de eliminar espécies reativas de oxigénio (ROS) são negativamente reguladas ao nível da transcrição genética pelo Repressor do Regulação do Peróxido (PerR).

De dados obtidos de transcritómica e proteómica ao expor células de *D. vulgaris* a *stress* oxidativo infere-se que, por exemplo, os genes redutase do hidroperóxido de alquilo (*ahpC*), rubreritina (*rbr*), nigeritina (*ngr*), tiol-peroxidase (*tpx*), bacterioferritina (*bfr*) e *perR* sejam regulados pela PerR (**Tabela 2.1**) [7, 12, 14].

Tabela 2.1 – Proteínas envolvidas na defesa contra o *stress* oxidativo reguladas pela PerR em *D. vulgaris*

Proteína	Reações Catalisadas	Referência
AhpC	$\text{RCH}_2\text{OOH} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{RCH}_2\text{OH} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}$	[15]
Rbr	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	[16]
Ngr		
Tpx	$\text{TPx}_{\text{red}} + \text{RCH}_2\text{OOH} \rightarrow \text{RCH}_2\text{OH} + \text{TPx}_{\text{ox}}^1$ $\text{TPx}_{\text{red}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{TPx}_{\text{ox}}$	[17]
Bfr	$2\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{Fe(III)}_{(\text{core})} + 2\text{H}_2\text{O}$	[10]
PerR	$\text{PerR}_{\text{red}} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{PerR}_{\text{ox}}^2 + \text{H}_2\text{O}$	[18]

Verificou-se que a resposta da *D. vulgaris* ao *stress* oxidativo é mais eficaz quando esta é tratada com oxigénio atmosférico antes de exposta a peróxido, sendo até mais resistente do que no caso da mutante sem o gene *perR* [11, 19]. Isto indica uma capacidade adaptativa da *D. vulgaris* ao meio em está inserida.

Não é portanto de admirar que esta capacidade de resposta ao *stress* oxidativo seja por vezes denominada de virulência, dada a resistência das células (mesmo que anaeróbias) à destruição por macrófagos, os quais produzem uma grande quantidade de ROS no combate às infeções [20].

Já está bem estabelecido portanto que a *D. vulgaris* tem mecanismos de defesa contra o *stress* oxidativo, intimamente regulados pela PerR. Apesar disso, a PerR ainda não foi estudada ao nível bioquímico neste organismo, pelo que se poderá apenas inferir o seu comportamento e estrutura a partir da proteína homóloga mais estudada, isolada a partir da bactéria *Bacillus (B.) subtilis*.

¹ A Tpx é regenerada posteriormente por uma tioredoxina utilizando FADH_2 como dador de eletrões.

² Desconhecem-se meios para a regeneração da PerR após a sua oxidação.

2.3 Sensores de *stress* oxidativo

Existem diferentes sensores de *stress* oxidativo nas bactérias sendo que todos devem obedecer a determinadas características gerais para serem eficientes [21]:

- 1) Não consumir o sinal ao qual está a responder;
- 2) Ser sensível a diferenças na concentração do sinal;
- 3) Ter características dinâmicas que permitam ao sensor ser ativado antes do sinal terminar.

Vários sensores são reguladores de genes de resposta ao *stress* oxidativo nas bactérias. Talvez o exemplo mais estudado seja a proteína OxyR de *E. coli*, um fator de transcrição que na presença de peróxido de hidrogénio forma pontes dissulfureto entre cisteínas ativando a transcrição de pelo menos 30 genes envolvidos direta ou indiretamente em funções antioxidantes, nomeadamente a redutase do hidroperóxido de alquilo, dps, peroxidases e fur. A oxidação da OxyR é reversível através da redução por glutathione [22, 23].

O fator de transcrição SoxR, também presente em *E. coli* é um outro regulador que na presença de superóxido ou óxido nítrico sofre oxidação dos seus centros [2Fe-2S] tornando-se um ativador de transcrição por recrutamento da RNA polimerase, permitindo a transcrição do gene soxS, que controla o regulão de resposta à presença de superóxido [23, 24].

Na bactéria *B. subtilis* encontram-se dois fatores de transcrição, relacionados com o *stress* oxidativo, já bem caracterizados: a PerR e a OhrR. Ambos se ligam às zonas promotoras dos genes impedindo a transcrição por parte da RNA polimerase, no entanto poderão ser sensores de diferentes moléculas. A OhrR reage com peróxidos orgânicos que vão oxidar uma cisteína essencial para a sua função regulatória, enquanto que a PerR reage com peróxido de hidrogénio [25 – 27]. No entanto não há registo de nenhum estudo que alguma vez tenha testado a reatividade da PerR na presença de peróxidos orgânicos.

Sendo a PerR o foco do presente trabalho, a próxima secção será dedicada a aprofundar um pouco mais o que se conhece sobre ela, em particular sobre a PerR isolada a partir de *B. subtilis* (BSPerR), visto ser homologa da menos estudada PerR de *D. vulgaris*.

2.4 A PerR de *Bacillus subtilis*

2.4.1 A superfamília FUR – “Ferric Uptake Regulator”

A superfamília FUR é constituída por proteínas que regulam a transcrição de genes responsáveis pelo controlo da concentração de metais na célula. Os principais membros desta família são a Fur – que regula a aquisição de ferro pelo organismo, a Zur – que regula a aquisição de zinco e a PerR – que, como já foi referido, é um sensor de *stress* oxidativo. Estudos realizados por diversos investigadores indicaram que a resposta da PerR à presença de espécies reativas de oxigénio é modulada pela concentração de metais regulatórios (ferro e manganês), apresentado, assim, uma interação funcional com a proteína Fur. Existem ainda outros membros da superfamília FUR presentes num número mais reduzido de bactérias, nomeadamente a Mur – regulador da aquisição de manganês, em organismos como *Rhodobacter sphaeroids* ou *Rhizobium tropici*, a Nur – regulador da aquisição de níquel, em organismos como *Modestobacter marinus* e *Acidothermus cellulolyticus* e a Irr – regulador de ferro hémico, em organismos como *Rhizobium tropici* e *Bartonella bacilliformis* (Tabela 2.2) [28, 29].

Tabela 2.2 – Proteínas pertencentes à superfamília FUR e os seus metais regulatórios.

Resposta principal	Proteína	Metal regulatório	Seleção de genes regulados
Disponibilidade de metais	Fur	Fe (II)	<i>hemA, irr, fur, bfr, sodB</i>
	Zur	Zn (II)	<i>zur, adhP</i>
	Nur	Ni (II)	<i>sodF, nikABCDE</i>
	Mur	Mn (II)	<i>mntABCD</i>
<i>Stress</i> oxidativo	PerR	Fe (II) e Mn (II)	<i>ahpC, rbr, ngr, tpx, bfr, perR</i>
Disponibilidade de grupos hémicos	Irr	Fe(II) hémico	<i>irr, hemB</i>

Como se observa na Tabela 2.2, os reguladores de transcrição que regulam a aquisição de determinado metal possui esse mesmo metal como cofactor, com função regulatória. No entanto vários parálogos da FUR podem estar envolvidos na mesma tarefa – como foi referido entre a PerR e a Fur, revelando uma complexa regulação de transcrição genética.

2.4.2 PerR: sequência e cofatores

Quando se procede a um alinhamento da sequência de aminoácidos da PerR de *D. vulgaris* com uma base de dados é vulgar obterem-se estruturas homólogas de proteínas da mesma família, nomeadamente reguladores da aquisição de ferro. No entanto é importante salientar que dada homologia de sequências de proteínas da mesma família, por vezes as anotações da Uniprot estão incorretas, como acontece com a denominada proteína Fur de *D. desulfuricans*, que se trata, na realidade, de uma PerR, como se pode verificar pelos resíduos de coordenação ao metal regulatório (**Figura 2.1**).

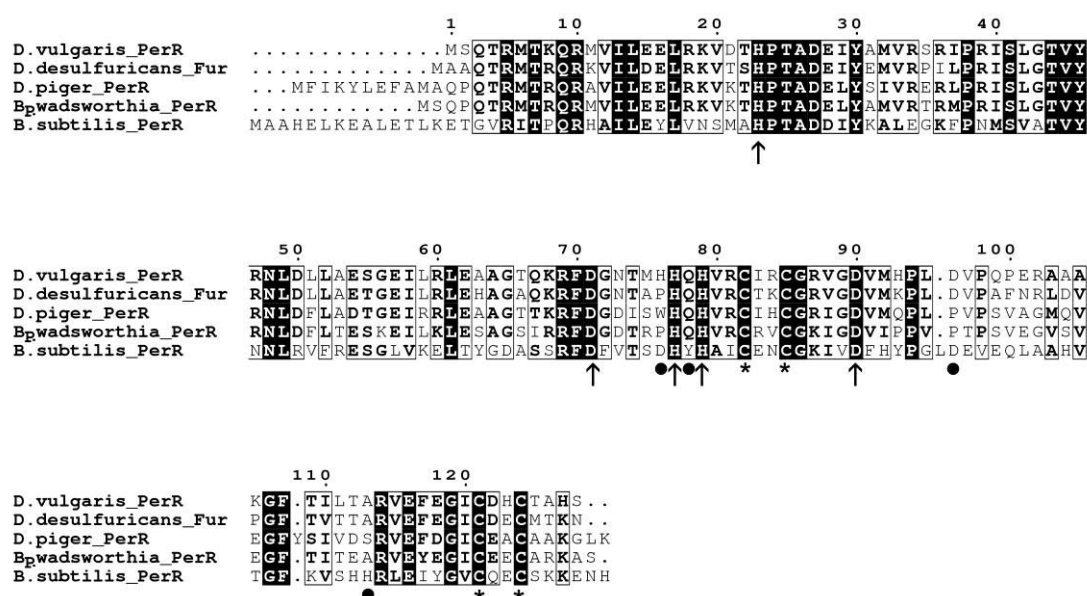


Figura 2.1 – Alinhamento da sequência de aminoácidos realizado nos programas ClustalO e ESPrpt [30 – 32], da PerR de *D. vulgaris* (Q726L2) com proteínas homólogas identificadas por Blast na UniprotKB [33]: Fur de *D. desulfuricans* (Q30V29), PerR de *D. piger* (B6WSJ4), PerR de *Bilophila* (*Bp.*) *wadsworthia* (E5Y8E7) e PerR de *B. subtilis* (P71086). Os resíduos conservados envolvidos na ligação ao metal regulatório estão marcados com uma seta; as cisteínas responsáveis pela ligação ao zinco, com papel estrutural de dimerização, estão marcados com um asterisco. Com bolas estão marcados os resíduos de um putativo terceiro local de coordenação a metais.

A BPerR, tal como a PerR de *D. vulgaris* (DVPerR), é um homodímero e conserva os resíduos de ligação aos cofatores metálicos: Zn, responsável pela dimerização (C96,C99,C136,C139)³, e Fe, envolvido na regulação da resposta ao peróxido (H37,D85,H91,H93,D104)³, tal como se pode observar na **Figura 2.2**.

Além destes dois locais, há um terceiro local putativo, o qual apresenta uma baixa afinidade pelo metal regulatório (D90,Y92,D111,H128)³, assinalado com bolas na **Figura 2.1**. Este local

³ Numeração dos resíduos corresponde à BPerR.

não apresenta metais nas estruturas cristalográficas obtidas até ao momento e verificou-se que mutações nesses resíduos fazem com que a proteína não responda à presença de peróxido. O local de baixa afinidade poderá modular a seletividade do metal para o local regulatório ou, talvez mais provavelmente, a sensibilidade ao peróxido [34].

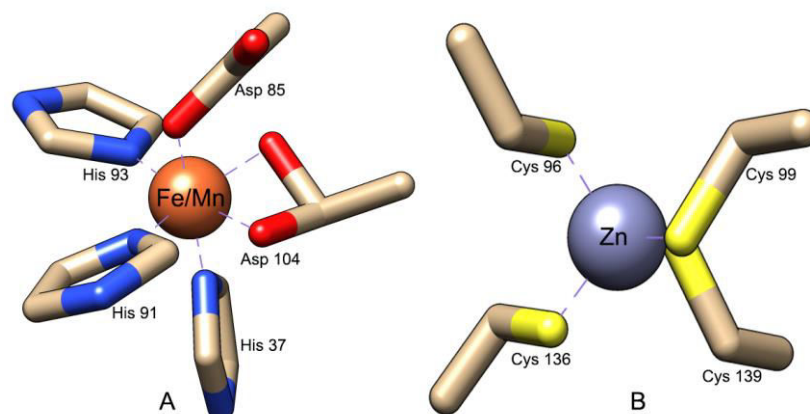


Figura 2.2 – Representação dos cofactores da BSPerR e dos aminoácidos que os coordenam. **A.** Local regulatório de ligação ao ferro ou ao manganês. **B.** Local estrutural de ligação ao zinco. Numeração das cadeias laterais dos resíduos corresponde à BSPerR.⁴

2.4.3 Regulação da transcrição de genes

Para exercer o seu papel de repressor da transcrição, a BSPerR liga-se a uma sequência *consensus* palindrômica de DNA rica em timinas e adeninas a montante dos locais -35 e -10 de reconhecimento da RNA polimerase (**Figura 2.3**), a qual é denominada PerR*box* [35].

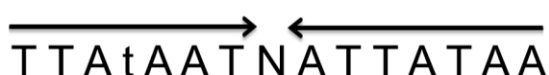


Figura 2.3 – Sequência palindrômica de DNA *consensus* de reconhecimento da BSPerR – PerR*box*. A letra “N” representa um qualquer nucleótido e a letra “t” indica que existe probabilidade de haver substituição desta timina por outro nucleótido.

A sequência de reconhecimento da PerR ainda não foi identificada na *D. vulgaris* mas dada a homologia entre esta e a BSPerR espera-se que a DVPerR também regule a transcrição interagindo com a sequência de DNA promotor dos genes que regula.

A BSPerR tem dois domínios, o C-terminal envolvido na dimerização da proteína, a qual ocorre na presença de zinco, conferindo estabilidade estrutural ao dímero (**Figura 2.4**); e o

⁴ UCSF Chimera, Version 1.8.1.

domínio N-terminal, responsável pela ligação da proteína ao DNA quando esta se encontra ligada ao seu cofator metálico (Mn ou Fe), no local regulatório. A presença do metal regulatório provoca uma alteração alostérica da proteína “recrutando” a histidina 37 que está distante do local dos restantes resíduos envolvidos neste local. Os resíduos do centro regulatório ficam dispostos com a geometria de uma pirâmide distorcida de base quadrada (**Figura 2.5**) [36, 37].

Desta forma pode dizer-se que a proteína tem duas conformações: inativa – aberta, ou ativa – fechada. Na conformação ativa, as hélices- α do domínio N-terminal da proteína interagem com o DNA, impedindo a transcrição genética [37].

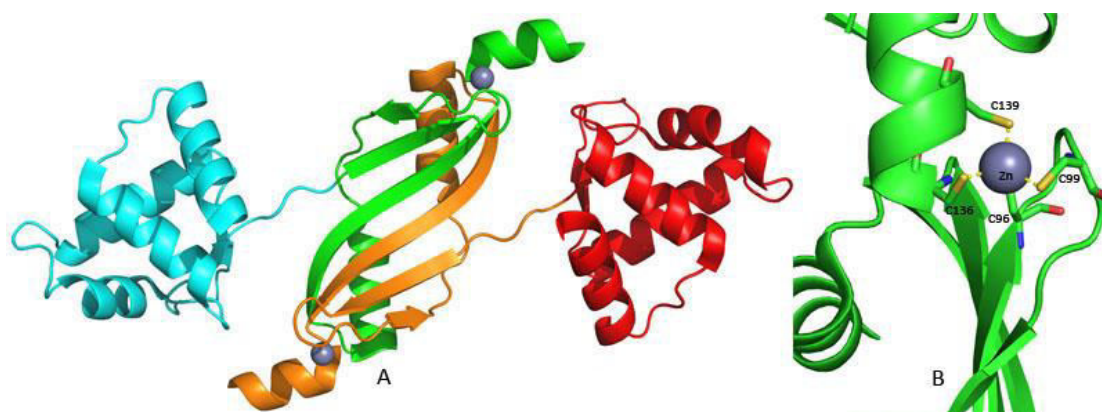


Figura 2.4 – Representação *cartoon* gerada no PyMol⁵ da BSPerR-Zn-Apo (PDB ID 2FE3) – conformação aberta. **A** – A azul e a vermelho estão representados o N-terminal de cada monómero; a verde e a laranja o C-terminal de cada monómero. **B** – Representação da zona onde o zinco se coordenada a 4 cisteínas.

⁵ The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC

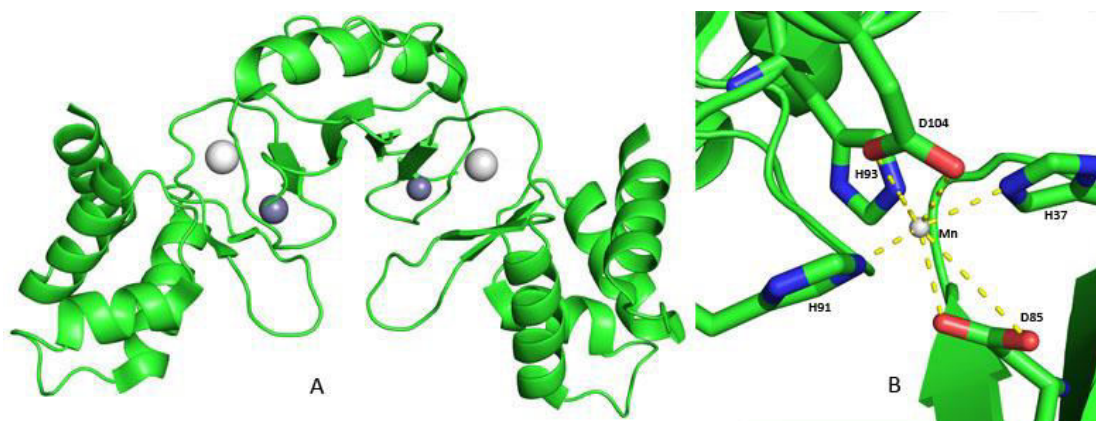


Figura 2.5 – Representação *cartoon* gerada no PyMol¹² da BSpErR-Zn-Mn (PDB ID 3F8N) – conformação fechada. **A** – Aspeto geral da proteína na conformação ativa; **B** – Pormenor da coordenação do manganês na BSpErR.

Há uma grande alteração conformacional na proteína tornando-a capaz de ligar ao DNA na forma ativa – com ferro ou manganês no local regulatório, como se pode observar pelo deslocamento dos N-terminal de cada monómero conferindo à BSpErR uma forma semelhante a um gancho (**Figura 2.5**).

É importante referir que ainda não existe uma estrutura determinada para a PerR com ferro, tal como não existe para a Fur, embora se considere que seja semelhante à de PerR com manganês.

2.4.3.1 Mecanismo da regulação da transcrição de genes

Numa fase inicial do estudo da BSpErR tentou-se desenhar um modelo que explicasse de que forma esta regula os genes de resposta ao *stress* oxidativo. Observou-se que após a oxidação da BSpErR por H_2O_2 esta deixa de se ligar ao DNA na zona do promotor dos genes de resposta ao *stress* oxidativo. No entanto, também se observou que na presença de um redutor (ditiotreitól) a BSpErR recuperava a função repressora [27, 29]. Talvez este modelo tenha sido postulado com vista a catalogar a PerR num tipo de sensores já conhecidos, como a anteriormente mencionada OxyR, no entanto existiam algumas falhas neste modelo e alguns aspectos do seu funcionamento que ficaram durante algum tempo por explicar.

Mais tarde verificou-se através de espectrometria de massa que a oxidação da proteína ocorre numa histidina (37 ou 91) postulando-se assim que o mecanismo de regulação dá-se por oxidação catalisada por um metal, neste caso o ferro – pois na presença de manganês a proteína não é sensível ao peróxido [18, 38], e que este cofator deixaria de estar presente na

forma oxidada da proteína devido ao enfraquecimento da sua esfera de coordenação por perda do ligando histidina.

Como indicado na **Equação 2.3**, o ferro ferroso na presença de peróxido de hidrogénio origina o anião radical hidroxilo. Este radical vai reagir rapidamente com uma histidina formando 2-oxo-histidina num processo em que há a possibilidade da transferência de um eletrão para o ferro férrico, tornando-o novamente ferroso (**Figura 2.6**).

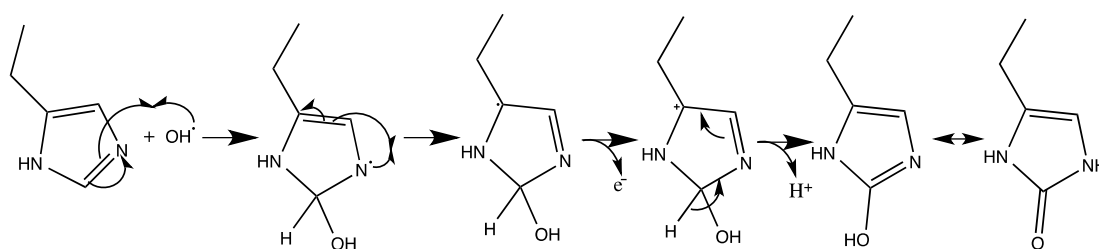


Figura 2.6 – Mecanismo de oxidação da histidina 37 ou 91 com o anião radical hidroxilo proveniente de uma reação de Fenton entre H_2O_2 e Fe(II) . Obtém-se no final a 2-oxo-histidina que apresenta tautomerismo ceto-enol.

O mecanismo de regulação pela PerR é resumido na (**Figura 2.7**). A PerR encontra-se na forma dimérica, apenas com o zinco estrutural, numa conformação aberta. Na presença de ferro ou manganês a PerR adota uma conformação fechada, tendo afinidade pelo DNA e impedindo a transcrição de genes. Na presença de H_2O_2 , o ferro oxida, assim como uma das histidinas que o coordenam – (o manganês têm uma reatividade muito mais baixa pelo H_2O_2 sendo que a proteína mantém a função repressora com este metal regulatório). Depois da oxidação a histidina oxidada não pode voltar a coordenar um metal regulatório, sendo que a proteína deverá seguir para degradação.

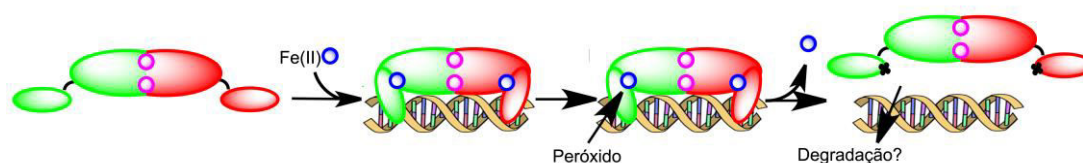


Figura 2.7 – Ilustração do modo de ação proposto da PerR na regulação genética. Na presença de ferro a PerR tem afinidade para a perR box DNA impedindo a transcrição genética. Após oxidação por H_2O_2 a proteína liberta o DNA, podendo seguir para degradação [38].

Apesar de existirem evidências a favor deste mecanismo, ainda não se sabe o que acontece ao ferro depois da oxidação, nem se há evidências para a formação de intermediários ferro-oxo.

Da mesma forma também não se sabe o que acontece à proteína após a sua oxidação: será degradada ou existirá alguma forma de a regenerar? O simples facto desta proteína poder ser sacrificial contrasta com a ideia de que um sensor tem a capacidade de se regenerar por forma a responder a variações do sinal que o ativa.

2.4.4 Propriedades espectroscópicas

2.4.4.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visível

O coeficiente de extinção molar que se encontra publicado para a BSPeR a 277 nm é de $9020 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [36, 37, 39].

Apesar de ser comum considerar-se o comprimento de onda máximo de absorção de uma proteína a 280 nm, isto nem sempre se verifica. O que confere a absorção às proteínas são os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e, com muito menor contribuição a fenilalanina. Estes aminoácidos têm comprimentos de onda de absorção máxima diferentes, como apresentado na **Tabela 2.3** [40].

Tabela 2.3 – Absorvância dos aminoácidos aromáticos em água e a pH neutro. Nas últimas colunas apresentam-se quantos aminoácidos de cada estão presentes na PerR.

Aminoácido	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	BSPeR	DVPerR
Triptofano	280	5600	0	0
Tirosina	275	1400	7	2
Fenilalanina	258	200	6	3

No caso da PerR, tanto a de *B. subtilis* como a de *D. vulgaris*, não existe qualquer triptofano, mas sim tirosinas e fenilalaninas. Isto explica o porquê do desvio aos habituais 280 nm.

Espera-se por isso um máximo de absorção a um comprimento de onda compreendido entre 258 e 275 nm para proteínas sem triptofanos, e no caso particular da PerR um desvio mais próximo dos 275 nm devido à maior contribuição por parte das tirosinas (**Figura 2.8**).

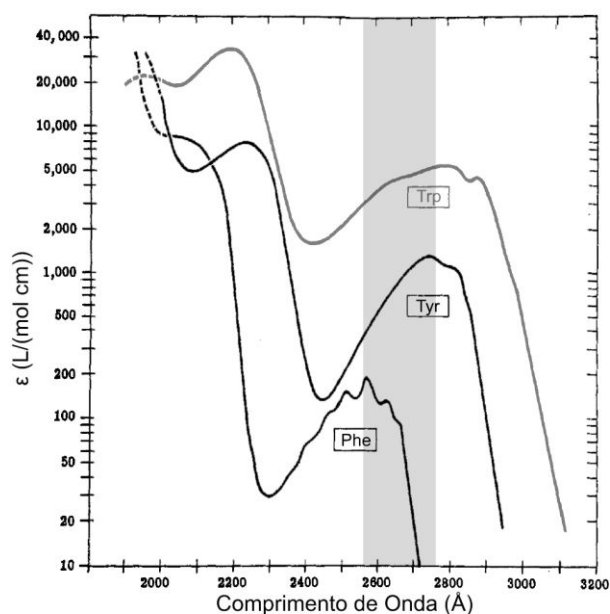


Figura 2.8 – Espectros de absorção de aminoácidos aromáticos a pH = 6. A sombreado encontra-se o intervalo de comprimentos de onda onde se espera existir um máximo de absorção para a PerR [41].

2.4.4.2 Espectroscopia de Mössbauer

Como já foi anteriormente mencionado, a PerR tem uma função semelhante à OxyR: é uma proteína que regula a transcrição de genes e é sensora da presença de peróxido de hidrogénio. Esta pertence à família FUR sendo homologa da proteína que regula a aquisição de ferro – Fur. Existem grandes semelhanças entre a Fur e a PerR, com exceção dos resíduos que coordenam o ferro. O centro de coordenação ao ferro na Fur de *B. subtilis* é constituído por duas histidinas, um aspartato e um glutamato na posição 104 (E104), enquanto que na PerR do mesmo organismo os ligandos do centro a que se liga Fe (II) ou Mn (II) são 3 histidinas e dois aspartatos. – **Figura 2.9**.

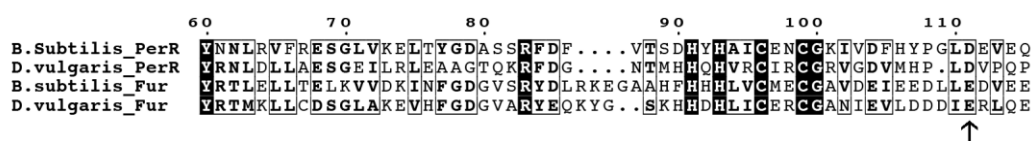


Figura 2.9 – Alinhamento de parte da sequência de aminoácidos preparada com ClustalO e ESPrpt [30 – 32], da PerR e Fur de *B. subtilis* (P71086 e P54574 respetivamente) com a PerR e a Fur de *D. vulgaris* (Q726L2 e Q72DI7 respetivamente). Assinalado com a seta está o resíduo 104⁶, aspartato na PerR e glutamato na Fur de cada organismo.

Visto a Fur não ser sensível ao peróxido de hidrogénio, colocou-se a hipótese de que o resíduo na posição 104 fosse responsável pela capacidade sensora da PerR.

Foram estudadas as alterações à esfera de coordenação do ferro quando se efetua uma mutação da BSPerR D104→E104 (ou, por simplicidade, BSPerR-D104E), através da espectroscopia de Mössbauer (**Tabela 2.4** e **Figura 2.10**) [39].

Tabela 2.4 – Parâmetros de Mössbauer para a BSPerR e BSPerR-D104E.

Proteína	δ (mm s ⁻¹)	ΔEQ (mm s ⁻¹)	%
BSPerR	1,21	3,05	87
	1,21	2,30	13
BSPerR-D104E	1,24	3,25	87
	1,23	2,59	13
Fur	1,18	3,21	100

⁶ Numeração dos resíduos corresponde à BSPerR.

Verifica-se que a mutação de um aspartato para um glutamato na PerR resulta num conjunto de parâmetros de Mössbauer idênticos à Fur. Além disso a proteína perde sensibilidade na presença de peróxido de hidrogénio, tal como ocorre com a Fur.

Como se pode observar pela **Figura 2.10** e pela **Tabela 2.4** a BSPerR tem um desdobramento de quadropolo (ΔE_Q) menor do que a BSPerR-D104E devido ao glutamato.

Postula-se que a mutação de aspartato para glutamato altera a forma como o carboxilato coordena o ferro impedindo a acessibilidade deste pelo peróxido de hidrogénio, embora sejam precisos mais dados para fundamentar esta observação, visto não existirem estruturas determinadas da Fur e da PerR com ferro.

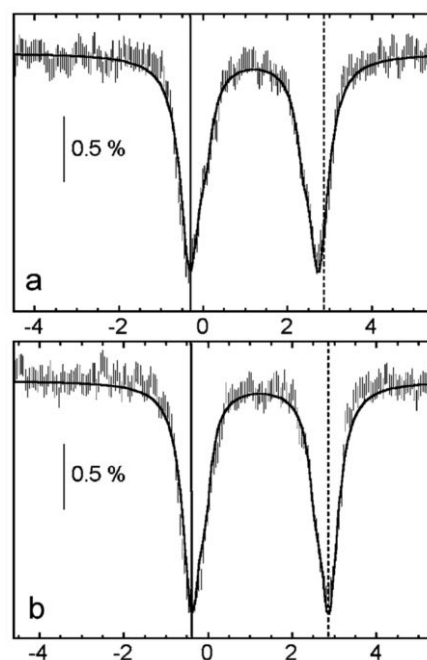


Figura 2.10 – Espectro de Mössbauer obtido a 4K de a) BSPerR e b) BSPerR-D104E. Os espectros estão alinhados pela velocidade de absorção mais baixa.

Bibliografia

- [1] J. F. Heidelberg, R. Seshadri, S. a Haveman, C. L. Hemme, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, J. a Eisen, N. Ward, B. Methe, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. Deboy, R. J. Dodson, a S. Durkin, R. Madupu, W. C. Nelson, S. a Sullivan, D. Fouts, D. H. Haft, J. Selengut, J. D. Peterson, T. M. Davidsen, N. Zafar, L. Zhou, D. Radune, G. Dimitrov, M. Hance, K. Tran, H. Khouri, J. Gill, T. R. Utterback, T. V Feldblyum, J. D. Wall, G. Voordouw, and C. M. Fraser, "The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 22, no. 5, pp. 554–9, May 2004.
- [2] J. Zhou, Q. He, C. L. Hemme, A. Mukhopadhyay, K. Hillesland, A. Zhou, Z. He, J. D. Van Nostrand, T. C. Hazen, D. a Stahl, J. D. Wall, and A. P. Arkin, "How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology.,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 6, pp. 452–66, Jun. 2011.
- [3] Y. J. Chang, A. D. Peacock, P. E. Long, J. R. Stephen, J. P. McKinley, S. J. Macnaughton, A. K. Hussain, A. M. Saxton, and D. C. White, "Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 7, pp. 3149–60, Jul. 2001.
- [4] H. Beyenal, R. K. Sani, B. M. Peyton, A. C. Dohnalkova, J. E. Amonette, and Z. Lewandowski, "Uranium immobilization by sulfate-reducing biofilms.,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 7, pp. 2067–74, Apr. 2004.
- [5] D. R. Lovley and E. J. Phillips, "Reduction of Chromate by *Desulfovibrio vulgaris* and Its c(3) Cytochrome.,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 60, no. 2, pp. 726–8, Feb. 1994.
- [6] J. D. Istok, J. M. Senko, L. R. Krumholz, D. Watson, M. a Bogle, a Peacock, Y. J. Chang, and D. C. White, "In situ bioreduction of technetium and uranium in a nitrate-contaminated aquifer.,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 2, pp. 468–75, Jan. 2004.
- [7] A. Mukhopadhyay, A. M. Redding, M. P. Joachimiak, A. P. Arkin, S. E. Borglin, P. S. Dehal, R. Chakraborty, J. T. Geller, T. C. Hazen, Q. He, D. C. Joyner, V. J. J. Martin, J. D. Wall, Z. K. Yang, J. Zhou, and J. D. Keasling, "Cell-wide responses to low-oxygen exposure in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.,” *J. Bacteriol.*, vol. 189, no. 16, pp. 5996–6010, Aug. 2007.
- [8] P. M. Pereira, Q. He, A. V Xavier, J. Zhou, I. a C. Pereira, and R. O. Louro, "Transcriptional response of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative stress mimicking environmental conditions.,” *Arch. Microbiol.*, vol. 189, no. 5, pp. 451–61, May 2008.
- [9] A. Zhou, Z. He, A. M. Redding-Johanson, A. Mukhopadhyay, C. L. Hemme, M. P. Joachimiak, F. Luo, Y. Deng, K. S. Bender, Q. He, J. D. Keasling, D. a Stahl, M. W. Fields, T. C. Hazen, A. P. Arkin, J. D. Wall, and J. Zhou, "Hydrogen peroxide-induced oxidative stress responses in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough.,” *Environ. Microbiol.*, vol. 12, no. 10, pp. 2645–57, Oct. 2010.
- [10] C. G. Timóteo, M. Guilherme, D. Penas, F. Folgosa, P. Tavares, and A. S. Pereira, "Desulfovibrio vulgaris bacterioferritin uses H₂O₂ as a co-substrate for iron oxidation and reveals DPS-like DNA protection and binding activities.,” *Biochem. J.*, vol. 446, no. 1, pp. 125–33, 2012.

- [11] J. D. Wildschut, S. M. Caffrey, J. K. Voordouw, and G. Voordouw, "Oxygen exposure increases resistance of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to killing by hydrogen peroxide.," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 101, no. 2, pp. 303–11, Feb. 2012.
- [12] A. L. Brioukhanov, M.-C. Durand, A. Dolla, and C. Aubert, "Response of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to hydrogen peroxide: enzymatic and transcriptional analyses.," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 310, no. 2, pp. 175–81, Sep. 2010.
- [13] J. a Imlay, "How obligatory is anaerobiosis?," *Mol. Microbiol.*, vol. 68, no. 4, pp. 801–4, May 2008.
- [14] M. C. O. Figueiredo, S. a L. Lobo, J. N. Carita, L. S. Nobre, and L. M. Saraiva, "Bacterioferritin protects the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough against oxygen.," *Anaerobe*, vol. 18, no. 4, pp. 454–8, Aug. 2012.
- [15] F. S. Jacobson, R. W. Morgan, M. F. Christmanlf, and B. N. Amesll, "An Alkyl Hydroperoxide Reductase from *Salmonella typhimurium* Involved in the Defense of DNA against Oxidative Damage," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. January 25, pp. 1488–1496, 1989.
- [16] E. D. Coulter, N. V Shenvi, and D. M. Kurtz, "NADH peroxidase activity of rubrerythrin.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 255, no. 2, pp. 317–23, Feb. 1999.
- [17] L. M. S. Baker and L. B. Poole, "Catalytic mechanism of thiol peroxidase from *Escherichia coli*. Sulfenic acid formation and overoxidation of essential CYS61.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 11, pp. 9203–11, Mar. 2003.
- [18] J.-W. Lee and J. D. Helmann, "The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation.," *Nature*, vol. 440, no. 7082, pp. 363–7, Mar. 2006.
- [19] F. Hillmann, R.-J. Fischer, F. Saint-Prix, L. Girbal, and H. Bahl, "PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*," *Mol. Microbiol.*, vol. 68, no. 4, pp. 848–60, May 2008.
- [20] S. Spiro and B. D'Autréaux, "Non-heme iron sensors of reactive oxygen and nitrogen species.," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 17, no. 9, pp. 1264–76, Nov. 2012.
- [21] H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne, H. Soares, and F. Antunes, "Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors.," *Redox Biol.*, vol. 2, pp. 535–562, Jan. 2014.
- [22] G. Storz, L. a Tartaglia, and B. N. Ames, "The OxyR regulon.," *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 58, no. 3, pp. 157–61, Oct. 1990.
- [23] G. Storz and J. A. Imlayt, "Oxidative stress," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 188–194, Apr. 1999.
- [24] T. Nunoshiba, T. deRojas-Walker, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, and B. Demple, "Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 90, no. 21, pp. 9993–7, Nov. 1993.

- [25] M. Fuangthong, S. Atichartpongkul, S. Mongkolsuk, and J. D. Helmann, "OhrR is a repressor of *ohrA*, a key organic hydroperoxide resistance determinant in *Bacillus subtilis*," *J. Bacteriol.*, vol. 183, no. 14, pp. 4134–41, Jul. 2001.
- [26] M. Fuangthong and J. D. Helmann, "The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 10, pp. 6690–5, May 2002.
- [27] A. F. Herbig and J. D. Helmann, "Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA," *Mol. Microbiol.*, vol. 41, no. 4, pp. 849–59, Aug. 2001.
- [28] M. F. Fillat, "The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 546, pp. 41–52, Mar. 2014.
- [29] M. Fuangthong, A. F. Herbig, N. Bsat, and J. D. Helmann, "Regulation of the *Bacillus subtilis* *fur* and *perR* Genes by PerR: Not All Members of the PerR Regulon Are Peroxide Inducible," *J. Bacteriol.*, vol. 184, no. 12, pp. 3276–3286, Jun. 2002.
- [30] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 539, p. 539, Jan. 2011.
- [31] M. Goujon, H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern, and R. Lopez, "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. Web Server issue, pp. W695–9, Jul. 2010.
- [32] P. Gouet, "ESPrpt/ENDscript: extracting and rendering sequence and 3D information from atomic structures of proteins," *Nucleic Acids Res.*, vol. 31, no. 13, pp. 3320–3323, Jul. 2003.
- [33] T. U. Consortium, "Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Database issue, pp. D191–8, Jan. 2014.
- [34] Z. Ma, J.-W. Lee, and J. D. Helmann, "Identification of altered function alleles that affect *Bacillus subtilis* PerR metal ion selectivity," *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 12, pp. 5036–44, Jul. 2011.
- [35] L. Chen, L. Keramati, and J. D. Helmann, "Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 18, pp. 8190–4, Aug. 1995.
- [36] L. Jacquamet, D. a K. Traoré, J.-L. Ferrer, O. Proux, D. Testemale, J.-L. Hazemann, E. Nazarenko, a El Ghazouani, C. Caux-Thang, V. Duarte, and J.-M. Latour, "Structural characterization of the active form of PerR: insights into the metal-induced activation of PerR and Fur proteins for DNA binding," *Mol. Microbiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 20–31, Jul. 2009.
- [37] D. a K. Traoré, A. El Ghazouani, S. Ilango, J. Dupuy, L. Jacquamet, J.-L. Ferrer, C. Caux-Thang, V. Duarte, and J.-M. Latour, "Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*," *Mol. Microbiol.*, vol. 61, no. 5, pp. 1211–9, Sep. 2006.

- [38] D. P. Giedroc, "Hydrogen peroxide sensing in *Bacillus subtilis*: it is all about the (metallo)regulator.," *Mol. Microbiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 1–4, Jul. 2009.
- [39] A. Parent, C. Caux-Thang, L. Signor, M. Clémancey, R. Sethu, G. Blondin, P. Maldivi, V. Duarte, and J.-M. Latour, "Single glutamate to aspartate mutation makes ferric uptake regulator (Fur) as sensitive to H₂O₂ as peroxide resistance regulator (PerR).," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 52, no. 39, pp. 10339–43, Sep. 2013.
- [40] M. R. Eftink, *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 35. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 1991, pp. 127–205.
- [41] D. Wetlaufer, "Ultraviolet spectra of proteins and amino acids," in *Adv. Protein Chem.*, vol. 17, Elsevier, 1963, pp. 303–390.

Capítulo 3. Expressão e purificação da PerR de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough

O presente capítulo descreve e justifica como se estabeleceu e otimizou um protocolo de expressão e purificação da proteína PerR de *D. vulgaris*. A facilidade com que a proteína forma corpos de inclusão revelou-se um problema desafiante para obter uma quantidade de proteína pura apropriada para os ensaios posteriormente pretendidos. Os equipamentos, marcas e protocolos não explicitados estão descritos na secção de apêndices.

3.1 O vetor de expressão pET28a_SUMO_PerR

O plasmídeo utilizado como vetor de expressão foi produzido no mesmo laboratório que este trabalho no âmbito de um projeto de licenciatura (**Figura 3.1**), e é baseado no vetor pET28a, um vetor para expressão de proteínas recombinantes com uma cauda de seis histidinas. [1] O vetor usado tinha já sido modificado, relativamente ao vetor comercial por inserção do gene que codifica para a proteína SUMO. O objectivo do uso deste vetor foi expressar a PerR com uma cauda de fusão N-terminal da proteína SUMO, a qual poderá conferir uma maior solubilidade à PerR. As tentativas de expressão da PerR de *D. vulgaris* anteriores tinham resultado na expressão da proteína sempre em corpos de inclusão e quando solubilizada e purificada a partir destes, a PerR apresentou-se sempre muito instável, de difícil manipulação, purificação e concentração [2, 3].

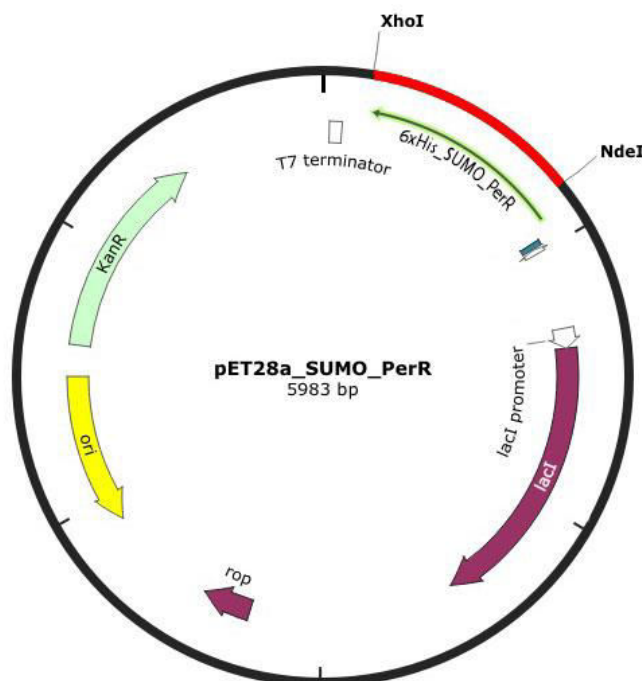


Figura 3.1 – Vetor de expressão pET28a_SUMO_PerR. Ori – origem de replicação; KanR – resistência à canamicina; rop – proteína repressora do *primer*; LacI – repressor do operão *lac*; *T7 terminator* – terminador da transcrição da polimerase T7. Entre as enzimas de restrição XhoI e NdeI está inserido o gene da proteína His₆-SUMO-PerR.

Este plasmídeo é considerado *low copy number* pois expressa a proteína Rop, cuja função é precisamente limitar o número de cópias do plasmídeo, por repressão da duplicação genética, ao modular a transcrição de RNA precursor [4]. Isto é especialmente importante dado que o objetivo principal deste plasmídeo é expressar proteína e não propagar DNA.

Como também se pode observar pela **Figura 3.1** o vetor confere resistência à canamicina (*kanR*), um antibiótico que afeta as subunidades 30S dos ribossomas procarióticos, levando a erros durante a tradução do RNA, impossibilitando a subsistência celular. O plasmídeo expressa uma fosfotransferase que irá fosforilar a canamicina, tornando-a inócua, permitindo assim às bactérias que adquirem este plasmídeo crescer na presença daquele antibiótico [5].

Por fim, há uma outra proteína que se expressa com este plasmídeo: o repressor do operão *lac* – LacI. Esta proteína impede a expressão da polimerase de RNA T7 (codificada no genoma das estirpes bacterianas com a denominação DE3) impossibilitando a expressão do gene *perR*, que se encontra sob o controlo do promotor T7. Só na presença de um indutor – lactose ou IPTG – a LacI é inativada permitindo a expressão da polimerase de RNA T7 e consequentemente da PerR [6].

É ainda importante referir que, como observado na **Figura 3.1**, se está a expressar uma fusão de proteínas, nomeadamente a SUMO juntamente com uma cauda de 6 histidinas e a PerR de *D. vulgaris*. Mais à frente explicar-se-á em detalhe a escolha desta proteína de fusão. No apêndice 8 pode-se também analisar a sequência da proteína de fusão, assim como as suas características calculadas pela ferramenta ProtParam [7].

3.2 Transformação de células competentes

Foram transformadas células competentes *Escherichia (E.) coli* NZY5α (NZYTech) conforme o protocolo do fornecedor (apêndice 3.1), com o pET28a_SUMO_PerR – pDNA (**Figura 3.2A**).

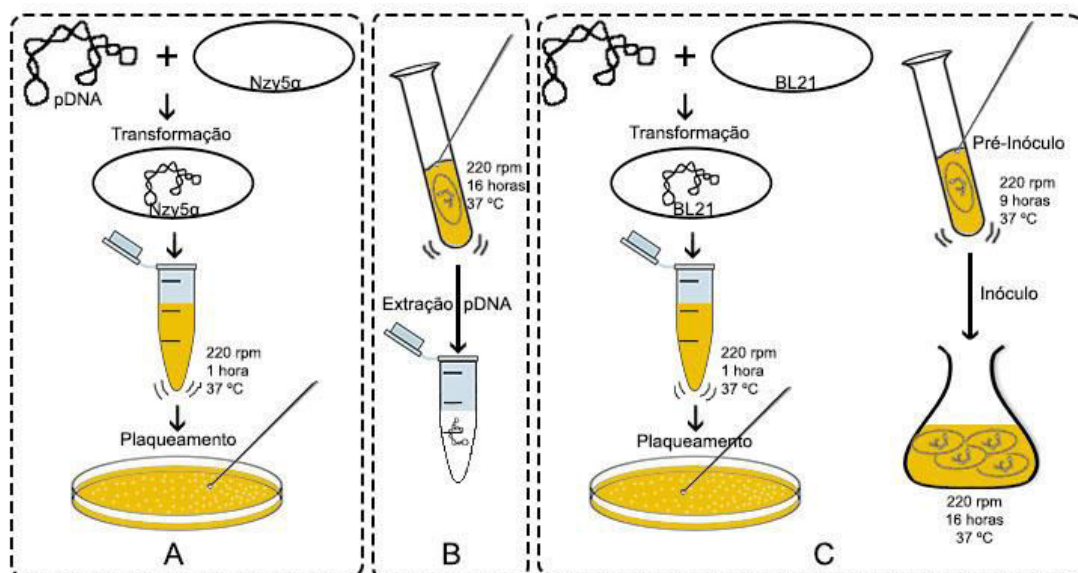


Figura 3.2 – Esquema ilustrativo do procedimento usado para a obtenção de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a_SUMO_PerR. **A** – Transformação de células *E. coli* NZY5α; **B** – Extração do DNA plasmídico amplificado a partir de colônias isoladas da placa obtida em A; **C** – Transformação de células *E. coli* BL21 (DE3) com o pDNA extraído de fresco e preparação de inóculos a partir de colônias isoladas.

As colônias que aparecem na placa de meio LB com canamicina são células transformadas com o plasmídeo. Para extração de DNA plasmídico, usa-se uma colônia isolada para inocular meio LB com canamicina, e deixa-se crescer durante a noite (não mais que 16 horas), usando-se, de seguida, um kit de Midiprep para uma extração de pDNA conforme o protocolo do fornecedor (apêndice 3.2) – **Figura 3.2B**. A **Figura 3.3** mostra um gel de agarose realizado com o objectivo de verificar o estado do pDNA extraído de dois crescimentos. Se compararmos com o pET28a_SUMO_PerR que se utilizou para transformar as células *E. coli* NZY5α (“pDNA Origem”, na figura), reparamos que este último apresenta uma grande quantidade de pDNA numa isoforma circular relaxada, com menor mobilidade eletroforética. Isto é um indicador de que o plasmídeo já é antigo e não se apresenta nas melhores condições. Também há uma sombra por volta de 6000 pares de bases (pb) (concordante com o número de pares de bases do vetor pET28a_SUMO_PerR) a qual deverá corresponder ao plasmídeo na forma linear.

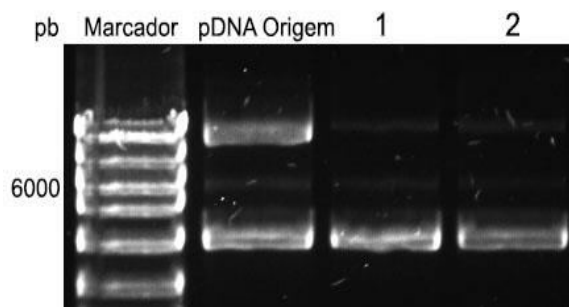


Figura 3.3 – Gel 0,8 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V, marcador *NZYDNA Ladder III*, para verificação da integridade e pureza do DNA plasmídico pET28a_SUMO_PerR, extraído a partir de células de *E. Coli* NZy5α, com um kit Miniprep (*NZYtech*). Verifica-se que o plasmídeo extraído de dois clones (1 e 2 na figura) tem a mesma mobilidade eletroforética que o utilizado para a transformação de *E. coli* NZy5α (pDNA origem, na figura).

O pDNA extraído servirá para transformar células competentes *E. coli* BL21 (DE3) NZYTech através do mesmo protocolo usado quando da transformação das células *E. coli* NZY5α, e após seleção das colônias são feitos pré-inóculos, que crescem durante 9 horas, para com eles se realizar o inóculo que crescerá durante 16 horas (**Figura 3.2C**). No início do dia seguinte, usam-se estes últimos crescimentos para inocular os crescimentos em volumes de meio superiores para se testarem diferentes condições de sobre-expressão.

Como a canamicina tem um tempo de meia vida de 15 dias a 4 °C, as transformações foram sempre efetuadas de fresco antes de se prosseguir para a sobre-expressão de proteína.

3.3 Sobre-expressão, preparação do extrato celular e purificação

Já vários estudantes do laboratório de Biofísica Molecular tentaram expressar a PerR de *D. vulgaris* numa forma solúvel, com níveis de sucesso variáveis [1–3]. Verificou-se num recente projeto de licenciatura que se consegue expressar alguma PerR solúvel nas seguintes condições [1]:

- Células *E. coli* BL21 (DE3) GOLD;
- Meio de cultura, 2xYT¹.
- Indução a densidade ótica elevada 600 nm ($D.O_{600T0}^2 \cong 2$);
- Adição de 0,1 mM de IPTG como indutor, após o qual as células são incubadas a 20 °C, durante 3 horas antes de serem recolhidas por centrifugação

Além das condições acima descritas, a PerR recombinante foi expressa em fusão com a proteína His₆-SUMO no seu N-terminal. Esta pequena proteína é conhecida por aumentar o nível de expressão solúvel de outras proteínas promovendo o seu enrolamento correto, além de ser facilmente clivada da restante cadeia polipeptídica pelo domínio catalítico da SUMO-proteíase (ULP1), uma proteína de fácil expressão [8]. A cauda de histidinas é uma mais valia, pois permite a purificação através de cromatografia de afinidade (IMAC - *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography*).

É também importante referir desde já que a massa calculada usando a sequência de aminoácidos da proteína de fusão His₆-SUMO-PerR é de 28 kDa (apêndice 8), sendo, no entanto, a sua mobilidade eletroforética em gel de SDS-PAGE anormal, tal como reportado para a proteína SUMO, pelo que a banda correspondente aparece com um coeficiente de mobilidade relativa equivalente a uma proteína de 32 kDa [1, 9].

¹ 2xYT – significa exatamente duas vezes a concentração de extrato de levedura e triptona presentes no tradicional meio LB. A concentração salina é omitida pois esta mantém-se igual.

² “T” antes de um número refere-se ao tempo de indução e o número à hora, i.e. T0 será o momento da indução, T1 refere-se a 1 hora após indução, e por aí em diante.

3.3.1 Testes de Sobre-expressão

3.3.1.1 Expressão da PerR de *D. vulgaris* e fracionamento

O objectivo destes testes é expressar o máximo de proteína numa forma solúvel. Para tal, recorreu-se ao que já se conhecia de diversos trabalhos anteriores e dos seus testes de crescimento, aplicando-se o protocolo esquematizado na **Figura 3.4**.

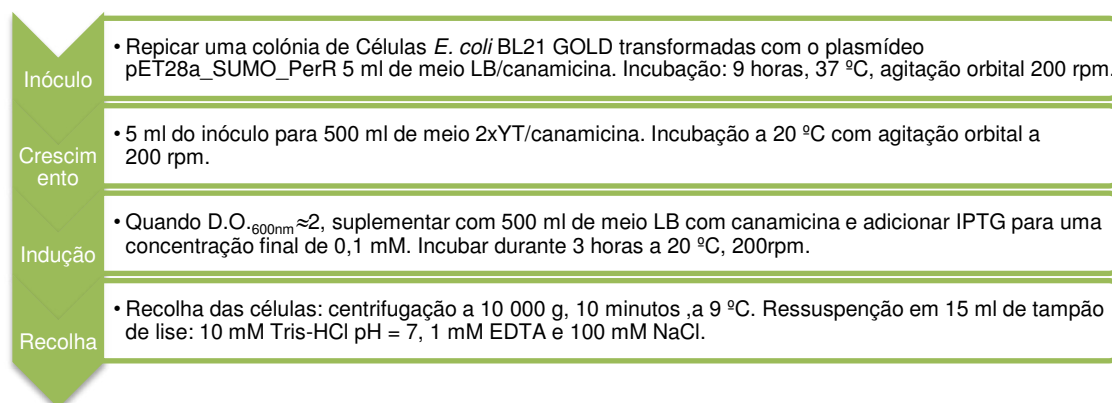


Figura 3.4 – Esquema do protocolo utilizado para expressar proteína solúvel.

Verificou-se pelo gel da **Figura 3.5**, que ao contrário dos testes realizados anteriormente com este mesmo clone da proteína de fusão His₆-SUMO-PerR , no âmbito de um projeto de licenciatura, não se verifica o aparecimento de uma banda intensa correspondente a uma nova proteína entre as amostras T0 e T3, retiradas, respectivamente, no momento da adição do indutor e após 3 horas de incubação [1]. Como no entanto, em ambos os poços, parecia existir uma banda com o peso esperado para a His₆-SUMO-PerR, decidiu-se avançar para a lise e fracionamento celular, com o objectivo de verificar se haveria alguma pequena parte de proteína na forma solúvel.

A lise consiste em destruir as células por forma a extrair do seu interior todas as proteínas. Neste processo também é libertado DNA e há o risco de haver desnaturação da proteína de interesse com o aumento de temperatura ou proteólise devida à presença de proteases. Por isso adiciona-se antes do fracionamento uma ponta de espátula de DNase e inibidores de proteólise – 1 mM PMSF e 10 mM Benzamidina, além de ser crucial manter-se o tubo *falcon* em gelo.

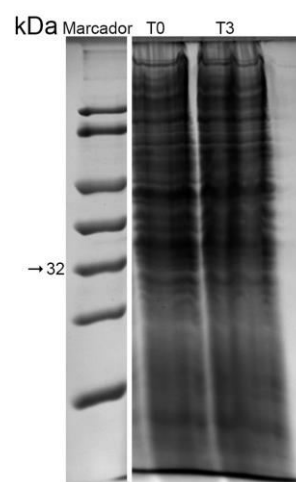


Figura 3.5 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora e 20 minutos a 120 V, com marcador LMW NZYTech, das amostras: T0, retirada no momento da indução e T3, 3 horas de incubação após a indução. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo.

A lise foi efectuada através de “freeze-thaw” e sonicação. Após a sonicação adicionou-se mais DNase, uma vez que a PerR é uma proteína de ligação ao DNA, e que em testes realizados no grupo de Biofísica Molecular, no âmbito de outros trabalhos académicos se tinha verificado que a presença de corpos de inclusão se deve maioritariamente ao facto de ela formar um complexo com o DNA de *E. coli*, e centrifugou-se a 10 000 xg, durante 10 minutos, a 9 °C [2]. Separou-se o sobrenadante, que foi ultracentrifugado: 180 000 xg, durante 1 hora, a 4 °C. O resultado dos fracionamentos e centrifugações pode ser observado no gel da **Figura 3.6**, em que se aplicou todos os sobrenadantes e sedimentos (*pellets*) de ambas as centrifugações.

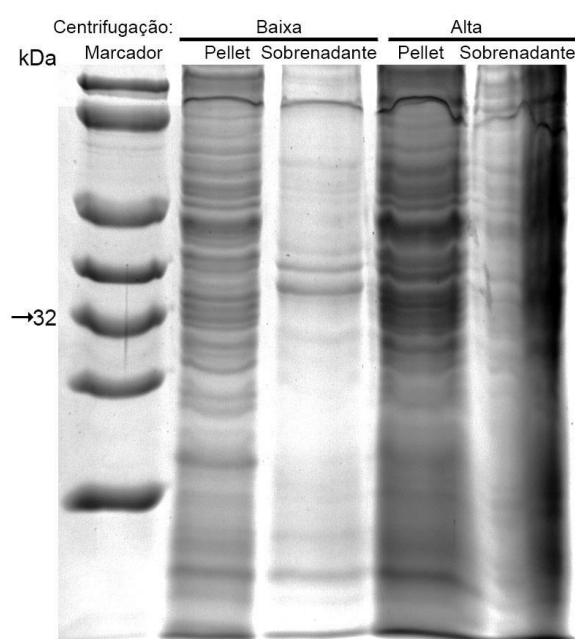


Figura 3.6 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora e 20 minutos a 120 V, com marcador LMW NZYTech, dos sedimentos (*pellets*) e sobrenadantes das centrifugações a baixa velocidade (10 000 xg) e alta velocidade (180 000 xg). A seta indica a zona onde se espera encontrar a banda correspondente à proteína de fusão PerR-SUMO.

Da observação da **Figura 3.6**, conclui-se que tal como se esperava pelos resultados do teste de expressão, não é evidente no gel de SDS-PAGE a presença da His₆-SUMO-PerR nos sobrenadantes das centrifugações. O teste de crescimento, lise e fracionamento celular foi repetido algumas vezes por forma a tentar detetar algum problema nas condições de crescimento, viabilidade das células, integridade do pDNA, e até se procurou verificar, alterando o lote que se usou, se o IPTG ou a canamicina estariam em condições. A única coisa que se pode dar a certeza nestes ensaios, maioritariamente realizados por uma colega de grupo, Isabel Silva, é que a DNase antiga que tínhamos já não atuava eficazmente (observado

pelo arrastamento de bandas ao longo do gel das **Figura 3.5** e **Figura 3.6**). Este problema desapareceu assim que se começou a utilizar um novo lote de DNase. Diversas tentativas foram também realizadas, variando o meio de cultura, estirpe celular, momento de indução e temperatura de incubação após indução, mas ainda assim não foi possível obter His₆-SUMO-PerR na forma solúvel em quantidade evidente num gel de SDS-PAGE. Ainda assim foram sendo recolhidos os sobrenadantes da ultracentrifugação e armazenados para se testar o procedimento de purificação, que, como se verá em seguida, é também um passo que concentra a proteína devido a ser realizado por cromatografia de afinidade.

3.3.1.2 Purificação por IMAC

O plano de purificação foi pensado com o mínimo número de passos, para ser o mais simples e eficaz possível. Tal como representado na **Figura 3.7**, o extrato proteico – ou seja, o sobrenadante da ultracentrifugação, é purificado por FPLC, sendo injetado numa coluna de afinidade IMAC, previamente carregada com níquel. Como a proteína que pretendemos purificar tem uma cauda de 6 histidinas, fica ligada ao níquel imobilizado na matriz da coluna e todas as proteínas, que não possuam afinidade para o níquel, são eliminadas nos passos de lavagem e adsorção. A vantagem deste tipo de cromatografia é, geralmente, a obtenção, num único passo de uma fração enriquecida na proteína que se pretende purificar com um elevado grau de pureza.

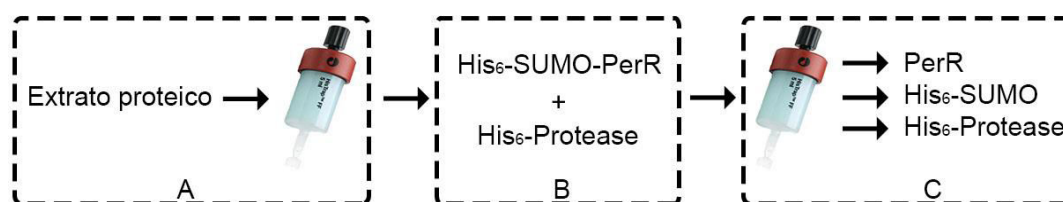


Figura 3.7 – Plano de purificação e corte da cauda de Histidinas da His₆-SUMO-PerR (o corte da cauda ficará, no entanto, reservado para o próximo capítulo).

Para eluir a His₆-SUMO-PerR, é necessário um tampão com uma elevada concentração de imidazole, que mimetiza a cadeia lateral da histidina, responsável pela ligação ao níquel, e numa elevada concentração que permita a desadsorção das proteínas ligadas à matriz cromatográfica.

Logicamente, será necessário um passo para remover o imidazole da proteína recolhida, podendo isto ser feito por diálise ou numa coluna de *desalting*.

Após remoção do imidazole, a PerR é hidrolisada com a protéase ULP1. Esta protéase também tem uma cauda de 6 histidinas, facilitando a sua separação, que pode ser conseguida recorrendo a uma nova passagem pela coluna IMAC. A PerR recombinante de *D. vulgaris* não adsorverá à matriz cromatográfica, saindo no passo de lavagem, e ficando a protéase e a cauda His₆-SUMO ligadas.

A **Figura 3.8** apresenta o cromatograma obtido numa das purificações efetuadas em condições similares às anteriormente explicitadas. A banda presente no cromatograma entre os 5 e os 25 minutos corresponde às proteínas não adsorvidas. O tubo correspondente à fração 3 contém a proteína eluída com 500 mM de imidazole (verifica-se através do aumento da condutividade quando é que o tampão de eluição começa a chegar ao tubos de recolha), que se verificou ser

a PerR-SUMO. A injeção na coluna His-trap de 5 ml foi feita a 4 ml min^{-1} e a recolha a 1 ml min^{-1} para tubos de ensaio.

Os tampões utilizados foram:

- A: 50 mM Kpi pH = 7, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 10 % glicerol
- B: 50 mM Kpi pH = 7, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazole, 10 % glicerol

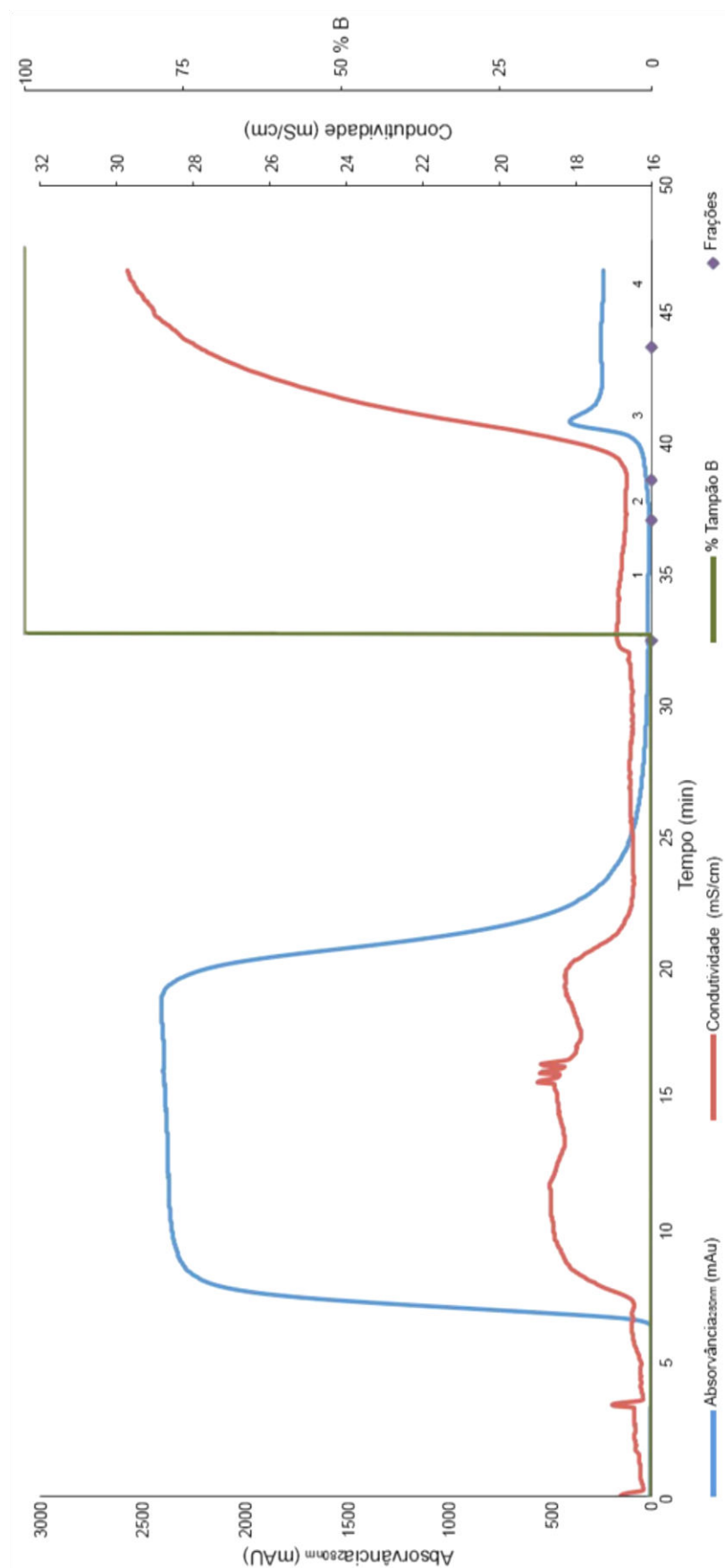


Figura 3.8 – Cromatograma obtido pela injeção do sobrenadante da ultracentrifugação das células lisadas, na coluna IMAC, 5mL (*GE Healthcare*). Monitorizou-se a presença de proteína nas frações através da absorvância a 280_{nm} (azul). Passo de injeção e lavagem a 4 ml/min, e eluição a 1 ml/min. Coluna equilibrada em 50 mM Kpi pH = 7, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 10 % glicerol (tampão A). Gradiente entre 20 e 500 mM de imidazole. Os pontos a roxo marcam o início da recolha em cada um dos tubos (nº dos tubos indicado).

Como se pode observar pelo cromatograma, o pico correspondente à proteína eluída tem uma área muito inferior em relação à proteína que sai no passo de lavagem da coluna. Este foi recolhido numa só fração (tubo 3) de 5 ml. Como se injetou sempre volumes entre 25 e 50 ml, é evidente uma das vantagens deste tipo de cromatografia, que é a concentração da proteína entre 5 e 10 x.

Numa fase inicial em que se estava a testar o comportamento da His₆-SUMO-PerR ao longo do processo de purificação, experimentou-se dialisá-la para tampão A sem imidazole no final da cromatografia de afinidade. Observou-se que a proteína tinha uma tendência a precipitar durante a diálise, pelo que se optou por outro método mais rápido: *desalting*, ou seja troca do tampão numa coluna de filtração em gel HiTrap (*GE Healthcare*, 5 ml) ligada a um ATKAprime Plus (*GE Healthcare*) (cromatograma na **Figura 3.9**) e equilibrada com tampão A.

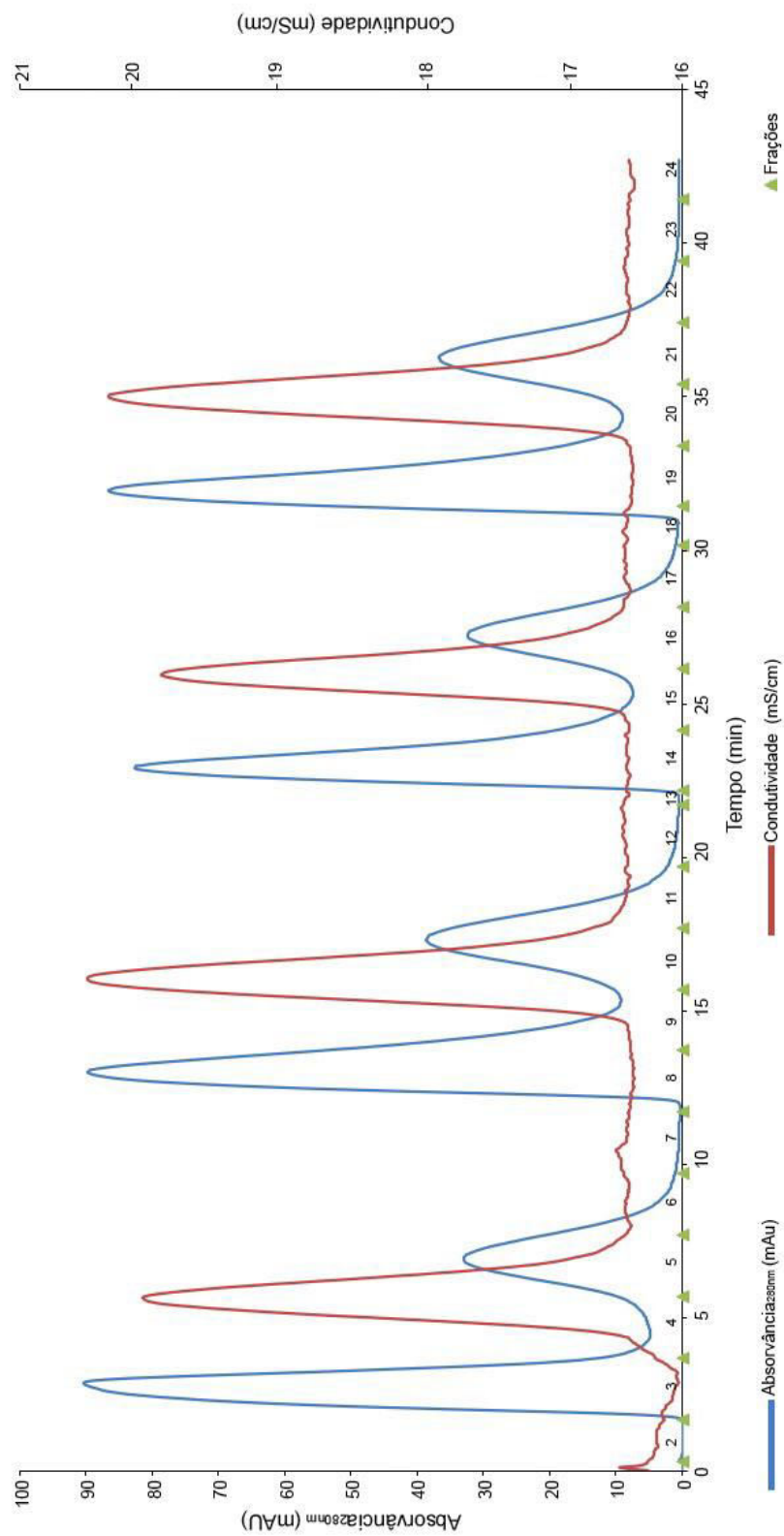


Figura 3.9 – Cromatograma obtido do *desalting* po FPLC do tubo 3 injetado na coluna em porções de 1,5 ml. Seguiu-se a saída de proteína através da absorvância a 280_{nm} (azul). A injeção na coluna foi feita à seringa através de um *loop* de 2 ml e recolhida a 1 ml/min para tubos de ensaio, em frações de 2 ml.

Observando a **Figura 3.9**, podemos constatar a presença de duas bandas na curva de absorvância, o que poderia dar a ilusão de que a amostra injetada seria constituída maioritariamente por duas proteínas bastante concentradas. No entanto uma das bandas deverá ser correspondente ao imidazole, já que este apresenta um elevado coeficiente de absorção a 280 nm, o que foi confirmado através do gel de SDS-PAGE. Verificou-se, assim que como seria de esperar, a His₆-SUMO-PerR corresponde à primeira banda de cada injeção (**Figura 3.11**).

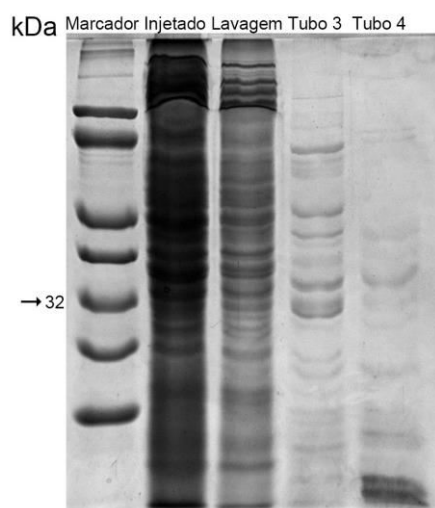


Figura 3.10 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora e 20 minutos a 120 V, com marcador LMW NZYTech, das fracções resultantes da separação por IMAC. A seta indica a zona da banda correspondente à proteína em estudo.

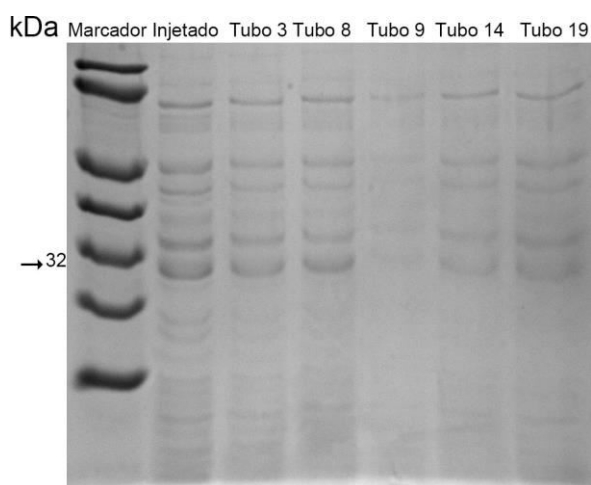


Figura 3.11 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora e 20 minutos a 120 V, com marcador LMW NZYTech, do *desalting* da fração 3 de HiTrap. A seta indica a zona da banda correspondente à proteína em estudo.

Como podemos verificar pela **Figura 3.10**, o tubo 3 contém a proteína de interesse, tendo muito menos proteínas contaminantes do que antes do passo de purificação (injetado). No

entanto, este processo de expressão e purificação para além de não permitir a obtenção da quantidade de proteína que se pretendia para os estudos por espectroscopia de EPR ou Mössbauer, não resultou também na obtenção da His₆-SUMO-PerR com o grau de pureza necessário, pois a intensidade da banda da proteína de interesse é semelhante às intensidades das bandas de outras proteínas. Assim resolveu-se tentar uma nova abordagem, a qual será descrita de seguida.

3.3.2 Solubilização e purificação da proteína a partir de corpos de inclusão

Tal como referido, o protocolo anteriormente descrito não permitiu a obtenção da quantidade de proteína pura necessária. Assim e tendo em conta que a grande maioria dos testes de sobre-expressão anteriormente realizados no âmbito de um projeto de licenciatura no grupo de Biofísica Molecular, resultou na expressão de uma elevada quantidade de His₆-SUMO-PerR mas em corpos de inclusão, adaptou-se um protocolo de solubilização de proteína a partir destes e posterior purificação [1, 10]. Este protocolo passou por vários testes de otimização até se chegar ao protocolo resumido de seguida, na **Figura 3.12**, e descrito no apêndice 4.

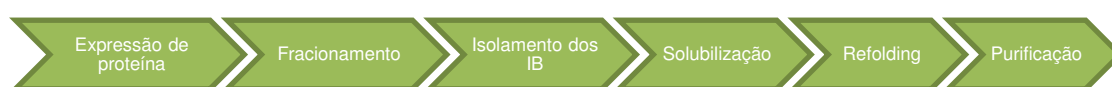


Figura 3.12 – Diagrama de fluxo com os passos necessários à purificação de proteína proveniente de corpos de inclusão (IB).

3.3.2.1 Expressão da proteína His₆-SUMO-PerR de *D. vulgaris* em *E. coli*, lise e fracionamento celular

À semelhança do processo anteriormente descrito (**Figura 3.2 C**) inocula-se com uma colónia resultante da transformação de células *E. coli* BL21 (DE3), meio LB com canamicina num balão erlenmeyer, que servirá de inóculo para os crescimentos a realizar no dia seguinte. A **Figura 3.13** descreve o processo desde a preparação do inóculo até à recolha de células.

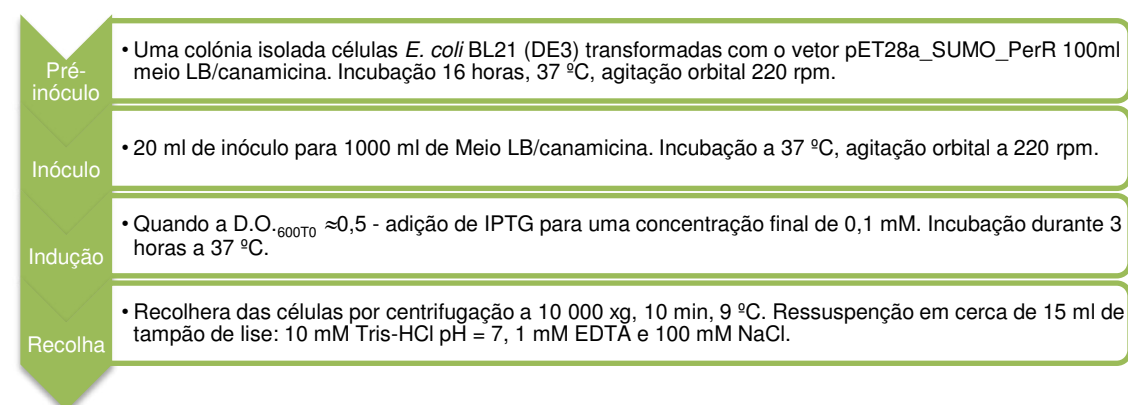


Figura 3.13 – Esquema do protocolo utilizado para expressar proteína insolúvel.

Como verificado pela **Figura 3.14**, as células BL21 (DE3) apresentam uma evidente sobre-expressão de proteína ao fim das 3 horas de indução – algo que não se destacava dos crescimentos anteriormente descritos, em que a indução da expressão da proteína de interesse

foi a uma elevada densidade ótica e em que a incubação após indução tinha sido realizada a 20 °C. Observando o gel da **Figura 3.14**, é também aparente a presença de uma banda com um coeficiente de mobilidade eletroforética semelhante ao da proteína de interesse, antes da adição de IPTG (amostra T0), podendo significar que estamos na presença de um promotor *leaky*, algo que não é fora do comum no sistema *lac* [11].

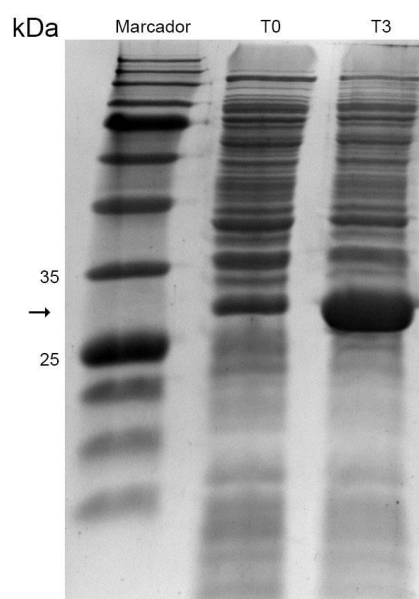


Figura 3.14 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, das amostras retiradas no momento de indução (T0) e 3 horas após (T3). A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo.

Para se ter a certeza que o problema de solubilidade não seria devido à ineficácia da lise celular, efetuaram-se 10 ciclos de sonicação, a 100 % de amplitude durante 3 minutos, com 3 minutos de intervalo – até não haver alteração no aspeto da suspensão celular.³ Seleccionaram-se algumas amostras para verificar a integridade celular e a possibilidade da existência de corpos de inclusão num microscópio ótico (**Figura 3.15**).

³ Adicionou-se uma ponta de espátula de DNase I antes e depois da sonicação para hidrolisar o DNA que se liberta ao fracionar as células.

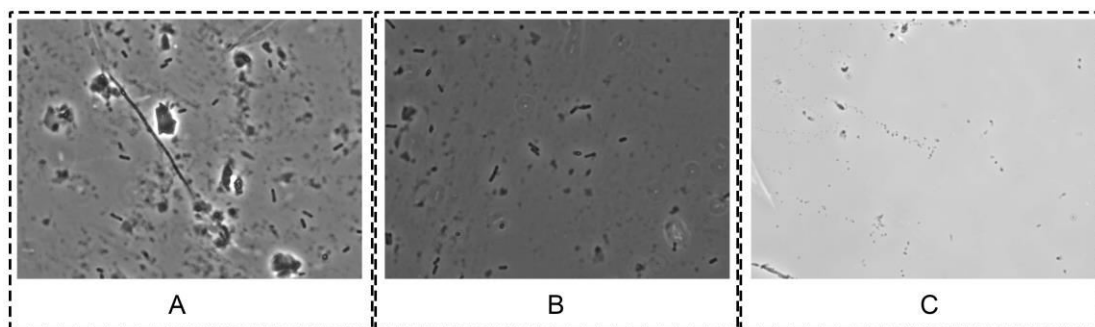


Figura 3.15 – Aspeto da suspensão celular, com uma ampliação de 100 x num microscópio ótico após: A – 0 ciclos de sonicação; B – 3 ciclos; C – 10 ciclos.

Como se pode verificar pela **Figura 3.15C**, só se garante que as células estão completamente partidas depois de cerca de 10 ciclos. A resistência das células à sonicação é elevada pois após 3 ciclos, **Figura 3.15B**, ainda são visíveis inúmeros bastonetes. Não se trata apenas um problema de ruptura celular. Confirma-se também aqui que estamos na presença de corpos de inclusão (pequenos pontos pretos na **Figura 3.15C**).

Dado que as células *E. coli* BL21 (DE3) apresentaram resultados de sobre-expressão promissores, resolveu-se expressar não o mais solúvel mas sim a maior quantidade possível para usando posteriormente um protocolo para solubilizar da proteína a partir de corpos de inclusão e proceder ao seu *refolding*.

3.3.2.2 Isolamento e solubilização da proteína presente nos corpos de inclusão

Após a lise celular, centrifugou-se 30 minutos a 10 000 xg, 9 °C e separou-se o sedimento (detritos celulares insolúveis e corpos de inclusão) do sobrenadante. O protocolo de isolamento e solubilização está resumido na **Figura 3.16**.

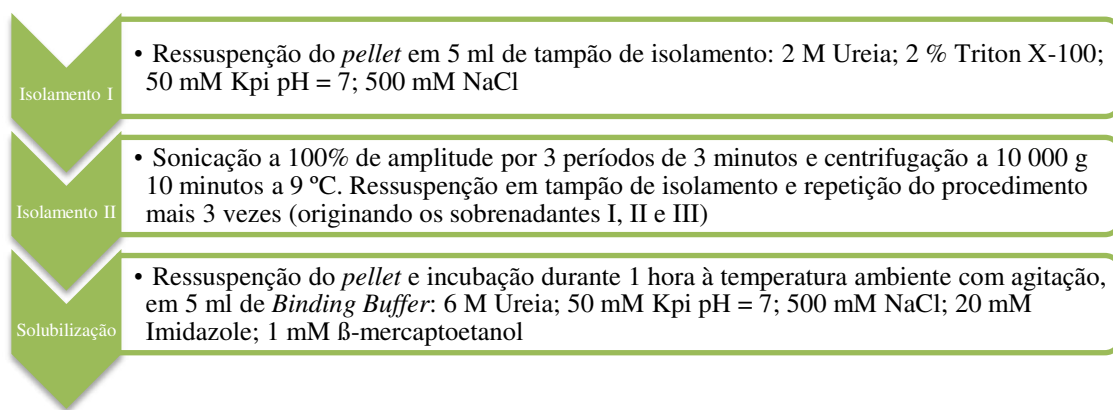


Figura 3.16 – Esquema do protocolo utilizado para isolar e solubilizar a His₆-SUMO-PerR a partir de corpos de inclusão.

No final da solubilização não se observam partículas em suspensão e após uma centrifugação a 10 000 xg, 10 minutos a 9 °C recolhe-se uma quantidade de *pellet* muito reduzida relativamente ao inicial. Na **Figura 3.17** mostra o gel de SDS-PAGE dos diversos sobrenadantes obtidos no procedimento descrito na **Figura 3.16**.

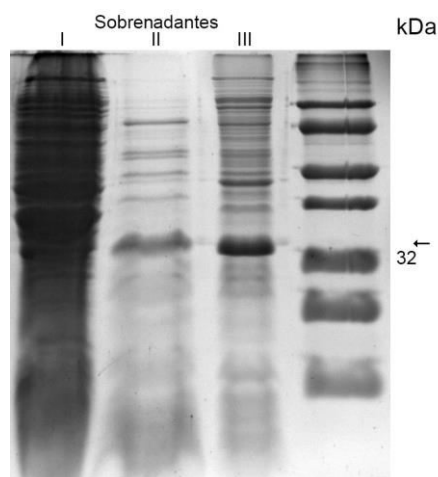


Figura 3.17 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos sobrenadantes de cada isolamento feito. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo.

Como é observável ao longo das lavagens perde-se parte da proteína de interesse que passou a encontrar-se num estado solúvel na presença de 2 M de ureia (poços II e III), um forte desnaturante. Apesar do isolamento ser bastante eficaz a remover outras proteínas e lípidos, depois da solubilização com 6 M de ureia ainda se efetuou uma centrifugação a 10 000 xg, 10 min a 9 °C e uma ultracentrifugação a 180 000 xg 1 hora a 4 °C.

Pela observação do gel da **Figura 3.18**, grande parte da proteína ainda se encontra insolúvel (*pellet* da centrifugação a baixa velocidade), mas uma quantidade nunca antes conseguida está solúvel (sobrenadante), e pronta para seguir no processo de purificação e *refolding*.

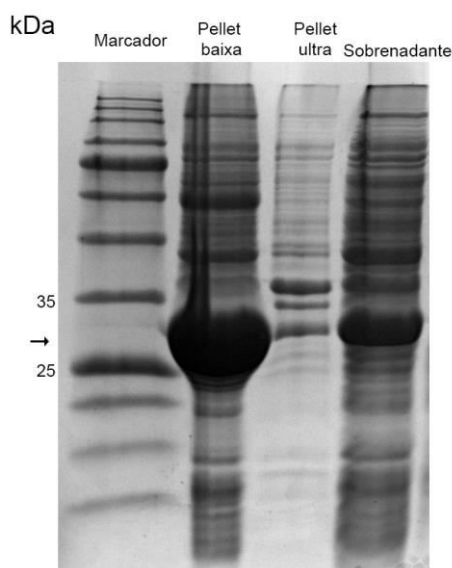


Figura 3.18 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos *pellets* de cada centrifugação e sobrenadantes correspondente. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo.

3.3.2.3 *Refolding* e purificação

O processo de aquisição da conformação correta (*refolding*) da His₆-SUMO-PerR e purificação ocorreram em conjunto num único processo denominado – “on-column refolding”. Ou seja, aproveitámos o facto de a proteína ter uma cauda de histidinas para ligar a His₆-SUMO-PerR sob condições desnaturantes a uma coluna de níquel (IMAC) e proceder uma renaturação lenta, usando como fase móvel da cromatografia um gradiente linear que se iniciou com o tampão com 6 M de ureia e se finalizou com o mesmo tampão mas sem ureia (ver legenda da **Figura 3.19**). Este processo é grandemente ajudado pela presença da cauda de fusão da proteína SUMO. Durante a injeção a maioria das proteínas contaminantes não adsorve a matriz cromatográfica, saindo durante este passo ou no passo de lavagem, sendo assim, um processo de purificação e de *refolding* simultâneos. Os tampões utilizados foram os seguintes:

- A: 50 mM Kpi pH = 7; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazole; 1 mM β-mercaptoetanol; 6 M Ureia;
- B: 50 mM Kpi pH = 7; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazole; 1 mM β-mercaptoetanol;
- C: 50 mM Kpi pH = 7; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazole; 10% glicerol.

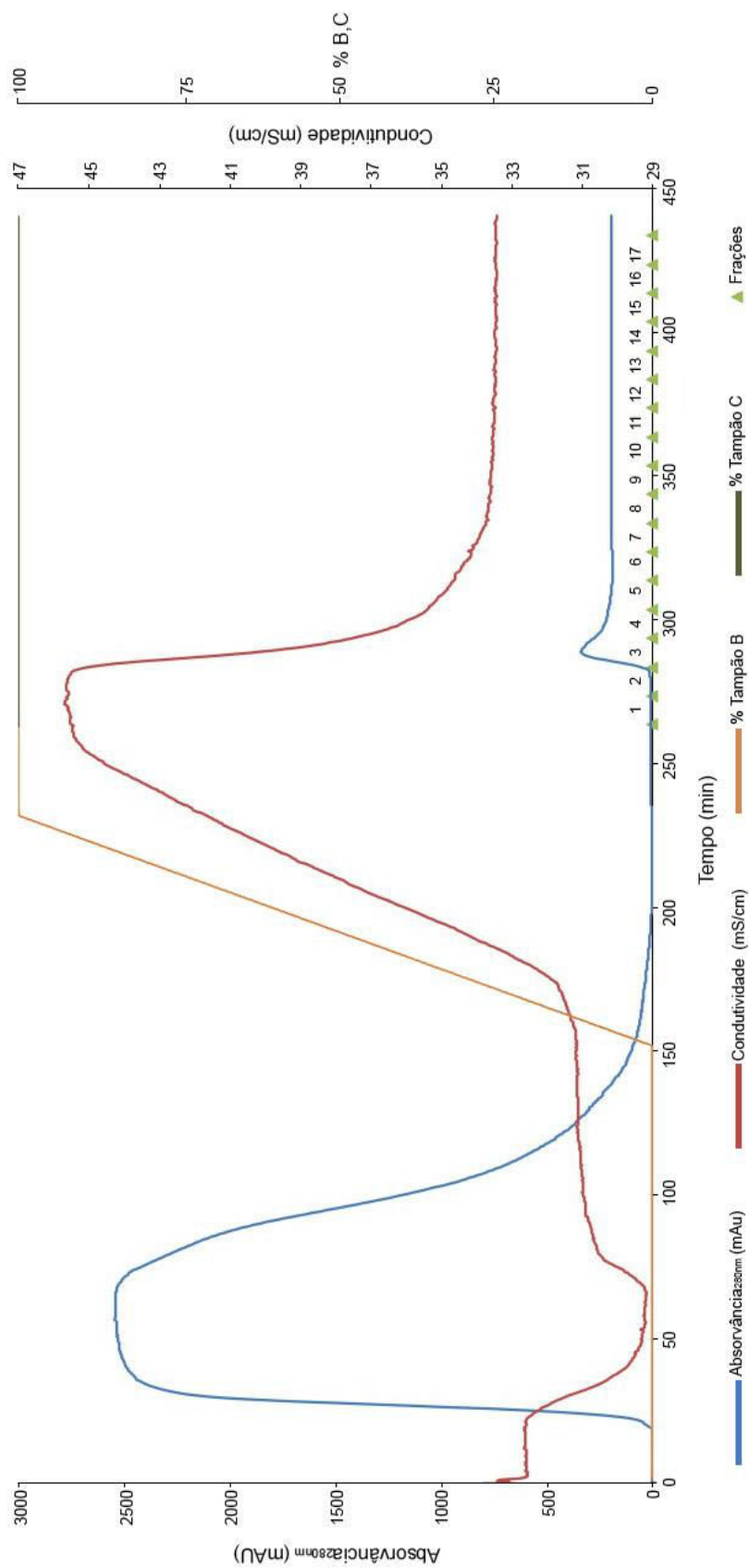


Figura 3.19 – Cromatograma da injeção do sobrenadante da solubilização dos corpos de inclusão com 6 M de ureia na coluna IMAC ligada ao AKTA prime plus, *on-column refolding* e eluição da His₆-SUMO-PerR. Gradiente linear (80 ml) entre tampão A e tampão B. Eluição a partir dos 150 minutos com o tampão C. A presença de proteína nas frações foi monitorizada através da absorvância a 280 nm. Caudal 1 ml/min. O momento de início de recolha de cada fração (de 10 ml cada) encontra-se assinalado a verde e o respetivo número da fração por cima.

Na **Figura 3.19** encontra-se o cromatograma obtido ao longo do processo de renaturação e purificação da His₆-SUMO-PerR na coluna por IMAC ligada ao AKTAprime plus.

A **Figura 3.20** mostra os géis realizados para verificação da eficácia do processo e dada presença e pureza da proteína His₆-SUMO-PerR em cada uma das frações.

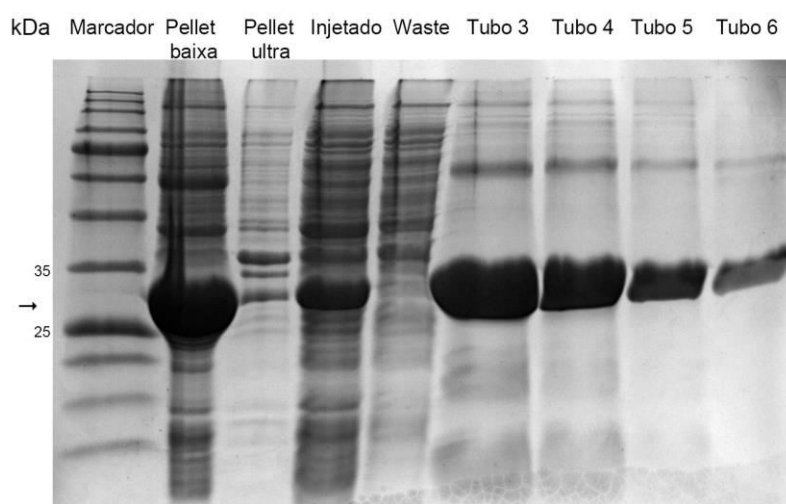


Figura 3.20 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos *pellets* de cada centrifugação e sobrenadante da ultracentrifugação (injetado). Waste corresponde à fração que saiu durante os passos de injeção e lavagem. Os tubos dizem respeito às frações recolhidas após a cromatografia IMAC, e correspondem aos números presentes no cromatograma da figura 3.19. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo.

No gel apresentado na **Figura 3.20** pode observar-se que a fração injetada na coluna IMAC (sobrenadante da ultra centrifugação), é rica numa proteína cuja mobilidade eletroforética é compatível com a His₆-SUMO-PerRe que a fração não adsorvida (*waste* – entre os 20 e os 200 minutos), possui a maioria das restantes proteínas contaminantes.

Os tubos 3 a 5 são aqueles em que a proteína se encontra mais concentrada, algo que pode surpreender pela observação do cromatograma no que respeita ao tubo 5. Acontece que o imidazole absorve ao mesmo comprimento de onda que as proteínas camuflando as concentrações mais baixas da mesma.

3.3.2.4 Diálises e concentração de proteína

Como já foi anteriormente referido, todas as tentativas passadas de manipulação da PerR após algum passo do purificação, revelou-se difícil devido à sua instabilidade em solução, revelando uma tendência para precipitar quando se altera o tampão em que esta se encontra. Os processos de diálise e concentração sempre causaram precipitação de proteína, por vezes quase total.

Com o processo de *refolding* obtém-se um elevado volume de proteína como imidazole, componente indesejável para a maioria dos métodos em que se pretende usar de seguida a proteína, sendo mais fácil usar a diálise para trocar tampão. Testaram-se diversas condições de diálise, tendo sido a mais bem sucedida uma alteração mínima no tampão, mantendo o glicerol a 10% e 500 mM de NaCl – tal como no tampão de eluição da proteína. Está aliás reportado que um homólogo da PerR (a Fur de *E. coli*) tende a ser mais solúvel a concentrações salinas elevadas apresentando uma tendência de *salting-in* [12].

A fração resultante do processo de *refolding* é dialisada contra tampão 50 mM KPi pH = 7; 500 mM NaCl; 10% glicerol pelo processo descrito. Esta segue então para diálise nas mesmas condições mas para tampão 50 mM MOPS pH = 7; 500 mM NaCl; 10% glicerol, sendo posteriormente armazenada numa câmara a -80 °C.

Também se testaram diversas formas de concentrar proteína; uma vez mais joga-se com a estabilidade da mesma. Numa fase inicial, quando ainda se tentava purificar proteína expressa na forma solúvel, utilizou-se um VivaCell 70 (*Sartorius*) com uma membrana de 5 kDa ou VivaSpin 6 (*GE Healthcare*) com uma membrana de 3 kDa. No entanto a eficácia da concentração revelou-se baixa além de extremamente lenta devido à presença de glicerol e, possivelmente, devido à colmatção da membrana com proteína precipitada.

O método de concentração que se demonstrou mais eficaz e sem precipitação de proteína, foi utilizando uma membrana de diálise e gel absorvente (*SpectrumLabs*). Ao envolver a membrana em gel absorvente, a 4 °C, este vai absorvendo água e pequenas moléculas que passam a membrana. Isto significa que se espera um aumento da concentração de proteína devido à diminuição do volume em que a mesma está contida. A **Figura 3.21** demonstra o decurso da concentração de um volume de 60 ml de proteína para 40 ml através de um espectro UV-visível.

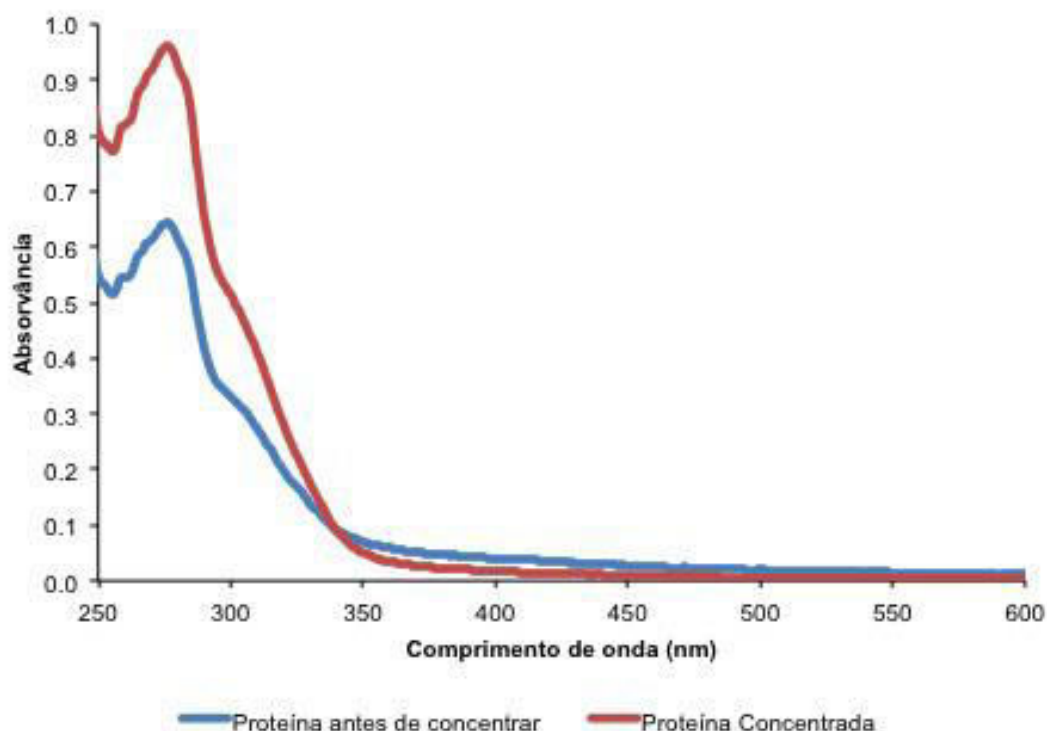


Figura 3.21 – Espectro de UV-visível da His₆-SUMO-PerR antes e depois de concentrada em gel absorvente.

Para completar todo o processo de produção e purificação de proteína resta quantificá-la.

3.4 Quantificação

Para quantificar a proteína recorreu-se ao método do BCA. Como este método permite determinar a quantidade de proteína total de uma amostra, deve-se utilizar uma fração de proteína o mais pura possível.

A proteína utilizada para este ensaio tinha o mesmo perfil eletroforético que o apresentado nos tubos de proteína eluída da **Figura 3.20**, o que vai ao encontro das nossas necessidades. No entanto a proteína foi dialisada 3 horas, com 3 alterações de 500 ml de tampão 50 mM Kpi e 500 mM NaCl em micro *Float-A-Lyser* de 500 µl da SpectrumLabs, com *cut-off* de 5 kDa. Desta forma não só se remove o imidazol, mas também o glicerol, que interfere no método de quantificação.

O princípio da quantificação através do método do BCA é a formação de um complexo entre a proteína e o Cu (II), que em condições alcalinas é reduzido a Cu (I) proporcionalmente à quantidade de proteína presente. Forma-se assim um complexo estável entre o BCA e o Cu (I), de cor púrpura. O protocolo detalhado utilizado para este ensaio assim como os resultados obtidos à construção da reta de calibração podem ser encontrados no apêndice 9.

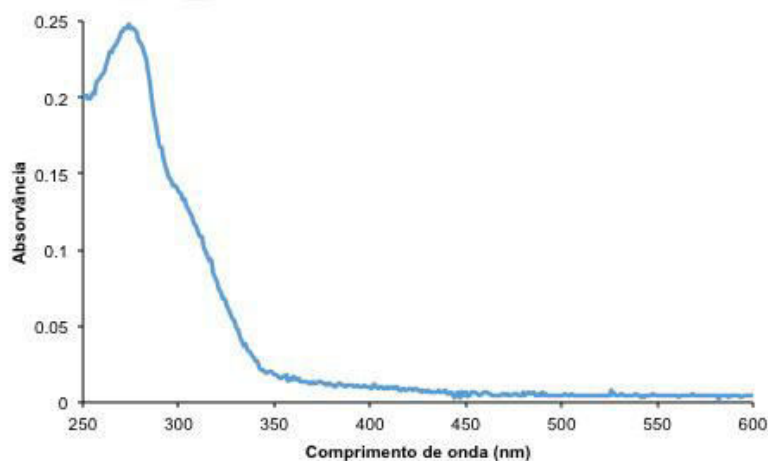


Figura 3.22 – Espectro de UV-visível da His₆-SUMO-PerR solubilizada a partir de corpos de inclusão e purificada numa coluna IMAC, em tampão 50 mM Kpi, 500 mM NaCl.

Com ambos os dados anteriores é possível traçar o gráfico de coeficientes de extinção molar em função do comprimento de onda (**Figura 3.23**).

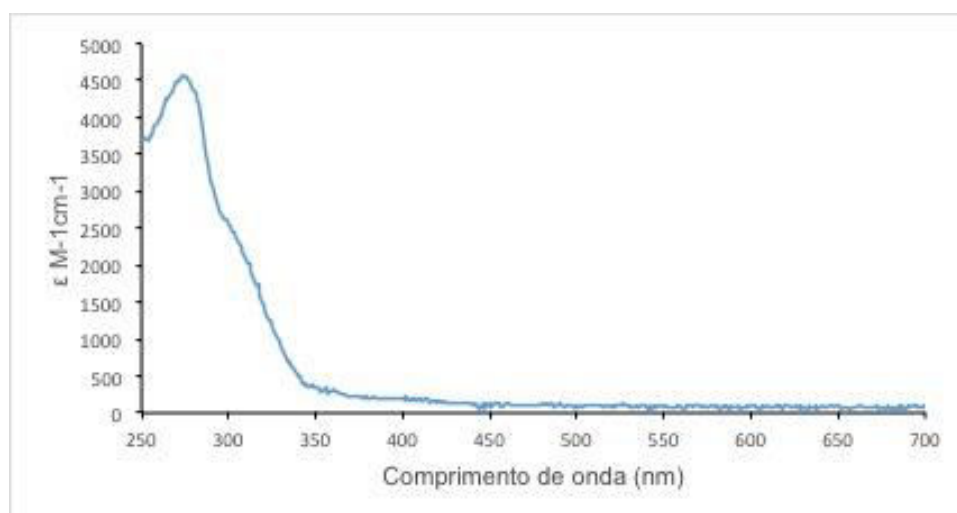


Figura 3.23 – Gráfico de coeficientes de extinção molar *versus* comprimento de onda da His₆-SUMO-PerR pura em tampão 50 mM Kpi, 500 mM NaCl.

Determina-se assim que ao comprimento de onda de 276 nm, temos um coeficiente de extinção molar de $4531 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A 280 nm o coeficiente de extinção molar é $4364 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, não muito diferente do teórico calculado na ferramenta bioinformática ExPASy-ProtParam: $4470 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7].

Determinou-se uma concentração de $54,1 \mu\text{M}$ para a fracção pura de His₆-SUMO-PerR na amostra que corresponde ao espectro de UV-Visível da **Figura 3.22**, com um volume 30 ml e uma quantidade total de proteína de 43 mg ou $1,62 \mu\text{mol}$, a partir de 4 l de crescimento e 13,3 g de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a_SUMO_PerR.

3.5 Protocolo de purificação e *refolding* alternativo com EDTA

Alternativamente ao protocolo de *on-column refolding* e purificação com imidazole, descrito na secção anterior decidiu-se experimentar uma abordagem diferente com o objetivo de se obterem frações de proteína mais concentrada e sem os problemas de alguma precipitação que se tiveram de início na presença de imidazole. Para isso realizou-se o mesmo protocolo de solubilização da proteína a partir dos corpos de inclusão, mas esta foi injetada na coluna IMAC com a resina carregada com zinco, em vez de níquel, dado que o zinco tem uma função estrutural na proteína. Além disso eluiu-se a proteína com num tampão de eluição semelhante, mas em que se substituiu o imidazole por 50 mM de EDTA.

Após este procedimento, seguiu-se o procedimento anteriormente descrito de diálise, para a retirar o EDTA do tampão em que a proteína se encontra dissolvida, e a concentração da proteína pelo método do gel absorvente.

O cromatograma pode ser observado na **Figura 3.24**, e o gel de SDS-PAGE de para monitorização do processo de purificação na **Figura 3.25**.

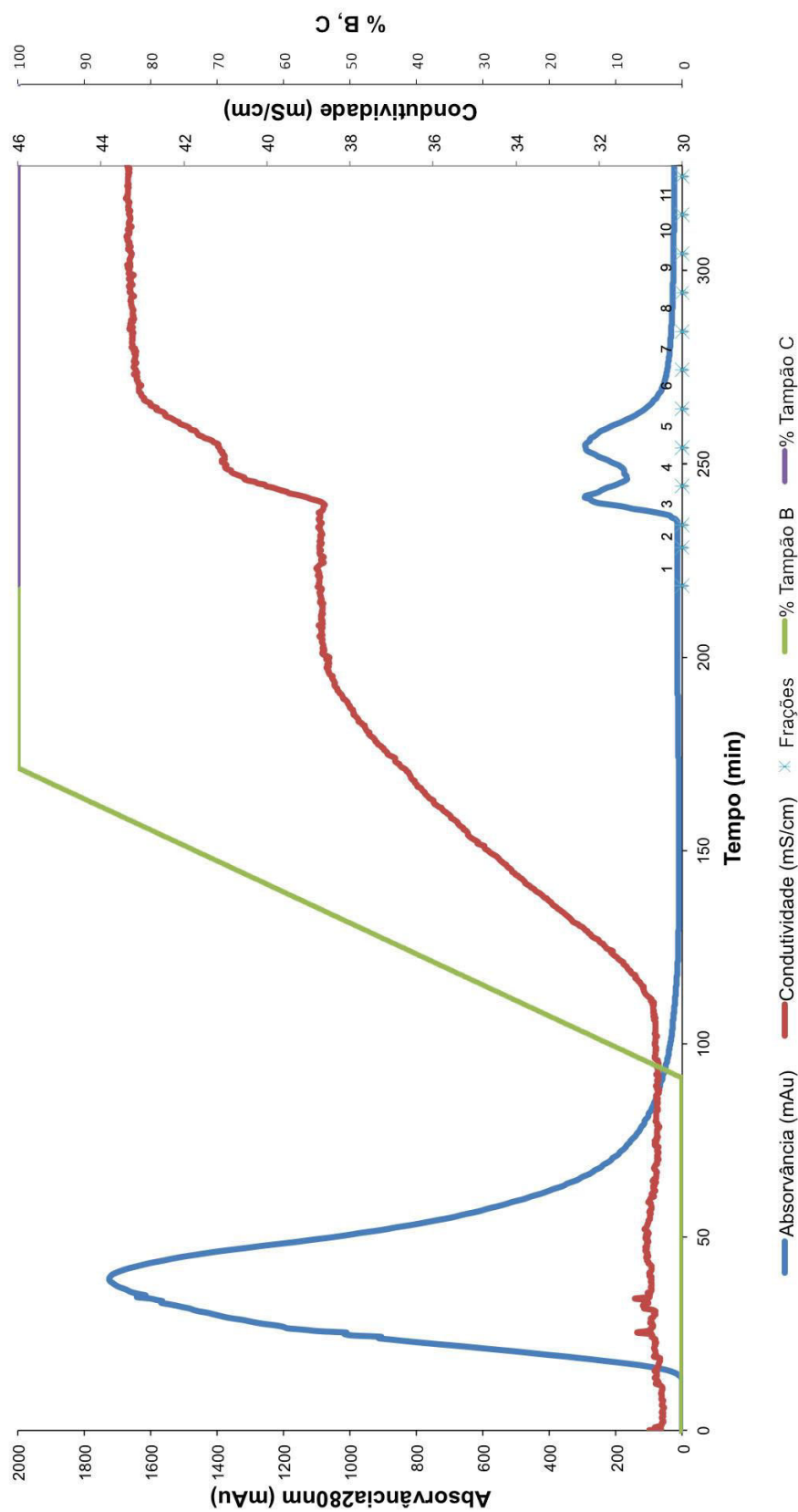


Figura 3.24 – Cromatograma obtido do *refolding* e purificação por FPLC do sobrenadante injetado na coluna. Seguiu-se a saída de proteína através da absorvância, sendo que entre os 20 e os 100 minutos correspondem a proteína que não agarra a coluna. Os tubos 3 a 6 possuem proteína eluída com 50 mM de EDTA no tampão C (substituindo o imidazole).

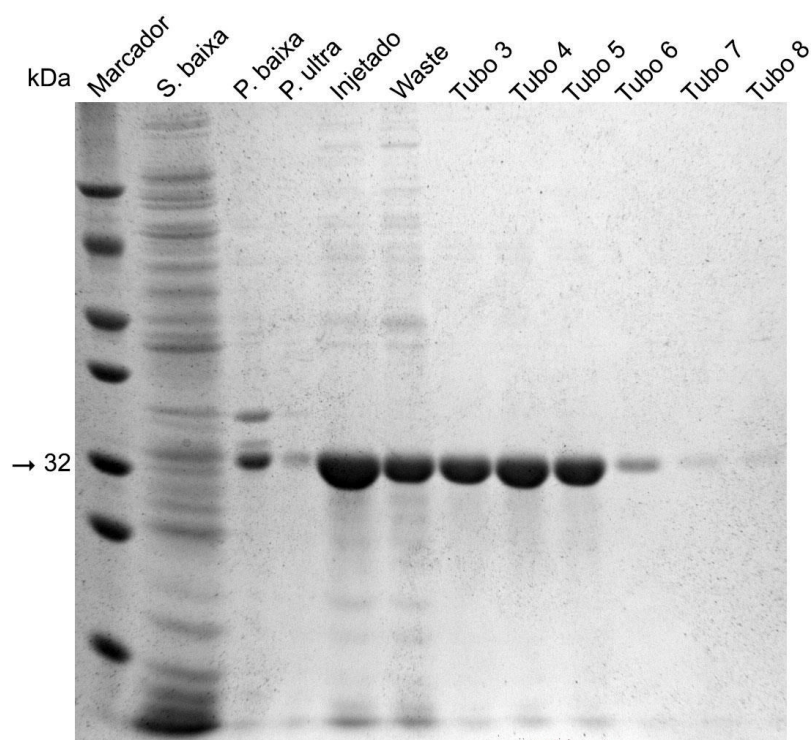


Figura 3.25 – Gel SDS-PAGE 12 %, corrido 1 hora a 160 V, com marcador LMW NZYTech, dos *pellets* (P.) de cada centrifugação e sobrenadantes (S. e Injetado) correspondente à ultracentrifugação. Os tubos dizem respeito às frações recolhidas após o processo. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína.

Pela análise do cromatograma, parecem sair duas bandas de proteína a diferentes tempos de retenção, o que não seria de esperar numa resina de afinidade em que se eluiu com 100% de tampão C (de eluição) e não se realizou um gradiente. Através da observação do gel da **Figura 3.25**, verificamos que ambas as bandas do correspondem a proteínas com mobilidade eletroforética semelhante, parecendo corresponder ambas à proteína His₆-SUMO-PerR. Além disso sobrecarregou-se a resina em proteína His₆-SUMO-PerR, (a fração de lavagem possui uma banda correspondente à nossa proteína, que não ligou à resina), possivelmente devido à menor afinidade da cauda de histidinas pelo zinco ou a uma maior quantidade de proteína resultante deste crescimento e processo de solubilização.

Determinou-se uma concentração de 410 μ M para a fracção pura de His₆-SUMO-PerR na amostra, com um volume 30 ml e uma quantidade total de proteína de 328 mg ou 12,3 μ mol, a partir de 4 l de crescimento de células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com o plasmídeo pET28a_SUMO_PerR.

3.6 Conclusão

A expressão solúvel da proteína de fusão His₆-SUMO-PerR, apesar de se ter demonstrado pouco eficiente, acabou por permitir a produção de uma quantidade de proteína ao longo de todos os testes de crescimento que foram efectuados que se revelou importante para testar um protocolo de purificação para a His₆-SUMO-PerR e verificação da sua estabilidade em diversas condições experimentais.

O sucesso do processo de *on-column refolding* e purificação simultâneos de proteína solubilizada a partir de corpos de inclusão demonstrou-se reprodutível e eficiente na quantidade de proteína obtida (chegou a obter-se concentrações de 150 μ M de proteína após diálises, e 1 mM de proteína após concentração). Este procedimento poderá ser igualmente eficaz na produção e purificação de proteínas homologas da PerR (ou em geral da família FUR), dado que se sabe por contacto com outros grupos de investigação que estas proteínas são muito difíceis de manter em solução e, principalmente, difíceis de concentrar até à concentração de 1 mM necessária para estudos em técnicas como a espectroscopia de Mössbauer.

A cauda de fusão N-terminal da proteína SUMO adota um papel determinante no *refolding* da PerR, estimulando o enrolamento da mesma.

Por fim experimentou-se uma abordagem alternativa ao protocolo estabelecido para a purificação, utilizando EDTA para eluir a proteína. Os ensaios descritos nos próximos capítulos irão revelar que esta alternativa não é sustentável, pelo que o protocolo acabou por ser colocado de lado. Ainda assim este protocolo revelou um enorme potencial ao se obter 10 vezes mais proteína solúvel que o protocolo com imidazole.

Bibliografia

- [1] V. Ribeiro, “Clonagem e sobre-expressão numa forma solúvel, da PerR de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [2] S. C. Matias, “Um Sensor de Peróxido de Hidrogénio numa Bactéria anaeróbia: A PerR de *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- [3] D. Sardinha, “Caracterização de um sensor de H₂O₂ de uma bactéria anaeróbia, solubilizada de corpos de inclusão,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [4] G. Cesareni, M. A. Muesing, and B. Polisky, “Control of ColE1 DNA replication: the rop gene product negatively affects transcription from the replication primer promoter,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 79, no. 20, pp. 6313–6317, 1982.
- [5] M. Mingeot-Leclercq, “Aminoglycosides: activity and resistance,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 4, pp. 727–737, 1999.
- [6] R. S. Donovan, C. W. Robinson, and B. R. Glick, “Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter,” *J. Ind. Microbiol.*, vol. 16, no. 3, pp. 145–54, Mar. 1996.
- [7] M. R. Wilkins, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, K. L. Williams, R. D. Appel, and D. F. Hochstrasser, “Protein identification and analysis tools in the ExPASy server,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 112, pp. 531–52, Jan. 1999.
- [8] A. Malhotra, *Tagging for protein expression.*, 1st ed., vol. 463, no. 09. Elsevier Inc., 2009, pp. 239–58.
- [9] J. G. Marblestone, S. C. Edavettal, Y. Lim, P. Lim, X. Zuo, and T. R. Butt, “Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO,” *Protein Sci.*, vol. 15, no. 1, pp. 182–9, Jan. 2006.
- [10] G. E. Healthcare, *Purifying Challenging Proteins. Principles and Methods*. Sweden. AB, Björkgatan 30: 75184: GE Healthcare Bio-Sciences Corporation, 2007, pp. 1–107.
- [11] F. Jacob and J. Monod, “Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins,” *J. Mol. Biol.*, vol. 3, no. 3, pp. 318–356, Jun. 1961.
- [12] S. Wee, J. B. Neilands, M. L. Bittner, B. C. Hemming, B. L. Haymore, and R. Seetharam, “Expression, isolation and properties of Fur (ferric uptake regulation) protein of *Escherichia coli* K 12,” *Biol. Met.*, no. 1, pp. 62–68, 1988.

Capítulo 4. Expressão e purificação de ULP1 e ensaios de hidrólise da cauda de SUMO

No presente capítulo encontra-se a descrição da purificação do domínio catalítico da proteína ULP1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta proteína tem a capacidade de hidrolisar a cauda N-terminal de proteína de fusão SUMO, com que a PerR de *D. vulgaris* foi expressa separando-a da PerR. Os equipamentos, marcas e protocolos não explicitados estão descritos na secção de apêndices.

4.1 Expressão de ULP1

O domínio catalítico de protéase da proteína SUMO (ULP1), de *Saccharomyces cerevisiae* foi expresso em células *E. coli* BL21 (DE3) GOLD transformadas com o vetor pET28a contendo o gene que codifica para o mesmo (pET28a_ULP1) (fornecidas por um colaborador). À semelhança da His₆-SUMO-PerR, a ULP1 foi expressa com uma cauda de 6 histidinas no seu N-terminal para facilitar a sua purificação por IMAC.

O protocolo usado para a expressão encontra-se esquematizado na **Figura 4.1**, podendo a sua versão detalhada ser consultada no apêndice 10.

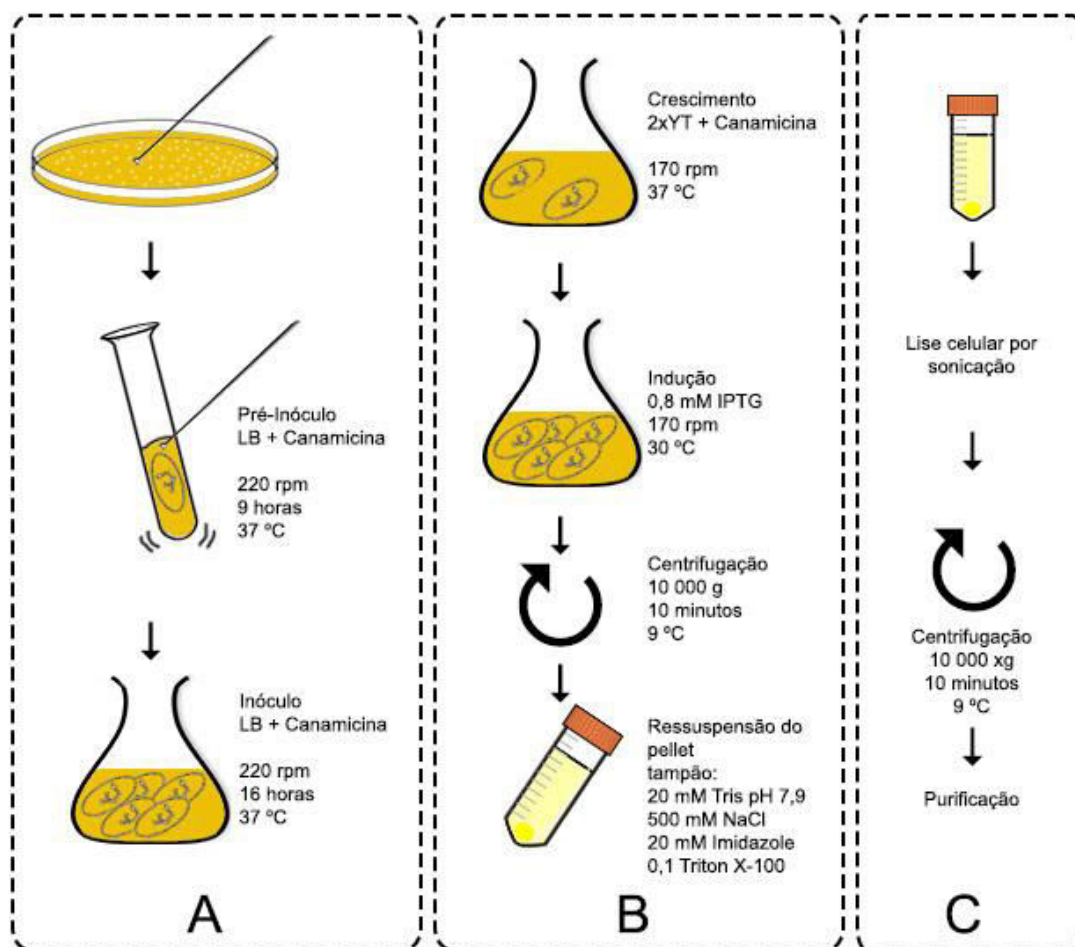


Figura 4.1 – Esquema do procedimento de expressão de ULP1. A – Pré-inóculo (a partir de uma colônia isolada) e inóculo, efetuados em meio LB com canamicina; B – Inóculo em meio 2xYT com canamicina e indução da expressão proteica à D.O._{600nm} de 0,8. Recolha das células por centrifugação, após 4 horas de incubação a 30°C. C – Lise celular por sonicação e centrifugação.

As células transformadas, assim como o protocolo de expressão e purificação foram fornecidos por um grupo de investigação da mesma instituição em que se realizou o presente trabalho, embora se tenham feito algumas adaptações – no caso da sobre-expressão; no caso da purificação aplicou-se um protocolo inteiramente diferente e mais simplificado.

4.2 Purificação de ULP1 por Cromatografia de afinidade (IMAC)

Após a centrifugação descrita na **Figura 4.1C**, recolhe-se o sobrenadante¹ para ser purificado numa coluna gravítica empacotada com uma resina IMAC Sepharose 6 Fast Flow (*GE Healthcare*) (**Figura 4.2**).

Preparou-se uma coluna gravítica com resina Ni Sepharose 6 Fast Flow da GE Healthcare recorrendo a uma seringa de 5 ml e um papel de filtro que se colocou no fundo de forma a que a resina se mantenha encerrada.

A coluna ficou com 1 cm de altura de resina e 1 cm de diâmetro. Por motivos de simplicidade considerou-se 1 volume da coluna 0,8 ml² – correspondente ao volume total da coluna.

Tampões utilizados:

- A. 20 mM Tris pH = 7,9; 200 mM NaCl 20 mM imidazole;
10 % glicerol;
- B. 20 mM Tris pH = 7,9; 200 mM NaCl 500 mM imidazole;
10 % glicerol.

Procedimento:

1. Lavou-se a coluna com água MilliQ e equilibrou-se com 5 volumes de coluna de tampão A;
2. Adicionou-se com movimentos circulares o sobrenadante rico em proteína previamente filtrado por um filtro de seringa de 0,45 µm;
3. Recolheu-se o eluído e lavou-se com 5 volumes de coluna de tampão A;
4. Eluíram-se as proteínas retidas na coluna em frações de cerca de 1 ml com tampão B;
5. Lavou-se com 5 volumes de coluna de tampão A, 5 volumes de coluna de água e guardou-se a resina a 4 °C numa solução 20 % etanol.

Após a purificação, recorreu-se à eletroforese em SDS-PAGE para identificar quais das frações recolhidas que possuem a proteína ULP1, bem como verificar o seu grau de pureza (**Figura 4.3**).



Figura 4.2 – Montagem da coluna gravítica com o sobrenadante aplicado.

¹ Fornecido pela Isabel Silva.

² Volume calculado = $\pi \times 0,5^2 \times 1 = 0,8 \text{ cm}^3$.

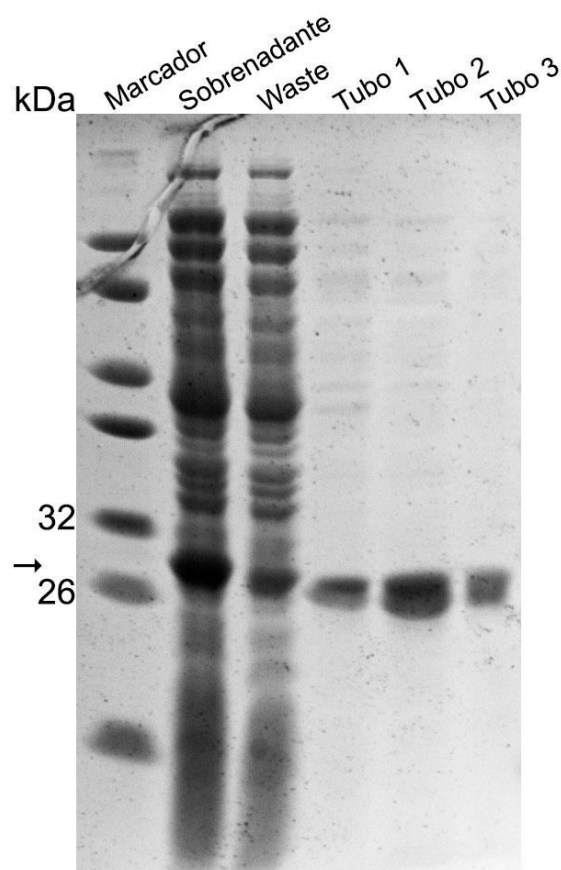


Figura 4.3 –Amersham ECL Gel 12%(*GE Healthcare*) , corrido 1 hora a 160 V de confirmação da purificação de ULP1. Poços: Marcador LMW NZYTech. Sobrenadante – aplicado na coluna; *waste* – fração que saiu durante os passos de injeção e lavagem. A seta indica a zona onde se encontra a banda correspondente à proteína.

Através da observação do gel da **Figura 4.3**, podemos verificar que a ULP1 deverá corresponder à banda assinalada com uma seta entre 26 e 32 kDa – correspondente ao domínio catalítico da ULP1.

As 3 frações recolhidas foram juntas e dialisadas contra tampão 20 mM Tris-HCl pH = 7,9; 200 mM NaCl; 1 mM DTT; 5 % glicerol. Foi utilizada uma membrana de diálise com *cut-off* de 3,5 kDa num Float-A-Lyser da *SpectrumLabs*, contra um volume de tampão de 1000 ml, com 3 mudanças de tampão a cada 1,5 horas.

4.3 Ensaios de hidrólise da cauda N-terminal de proteína SUMO

Como dito no capítulo anterior, o objectivo destes ensaios é cortar a cauda de histidinas e de proteína SUMO que estão ligadas ao N-terminal da PerR, e purificar a PerR resultante. Para tal utilizou-se a ULP1.

Numa primeira abordagem testaram-se várias condições de hidrólise. Segundo uma empresa que comercializa este sistema (*LifeSensors Inc.*), podemos hidrolisar uma proteína a 30 °C durante uma hora ou a 4 °C durante 16 horas. Alternativamente pode-se fazer os dois procedimentos de seguida.

Como teste de actividade da ULP1 purificada no laboratório usou-se uma proteína de controlo: SUMO-GFP (*LifeSensors*), (Hidrólise 2 na **Figura 4.4**). Também se cortou a mesma proteína de controlo com ULP1 comercial (*LifeSensors*) (Hidrólise 1 na **Figura 4.4**).

Como é evidente a partir da observação do gel presente na **Figura 4.4**, a hidrólise apresenta um grau de eficiência semelhante com as duas enzimas testadas, embora se tenha adicionado mais enzima do que seria necessário para uma hidrólise completa (o teste foi realizado com 5 µg de SUMO-GFP e 5 U³ de ULP1).

³ Segundo o fabricante 1 U de ULP1 cliva 90 µg de SUMO-GFP em 1 hora a 37 °C, logo teríamos enzima suficiente para hidrolisar 90 x mais SUMO-GFP do que a quantidade presente no ensaio.

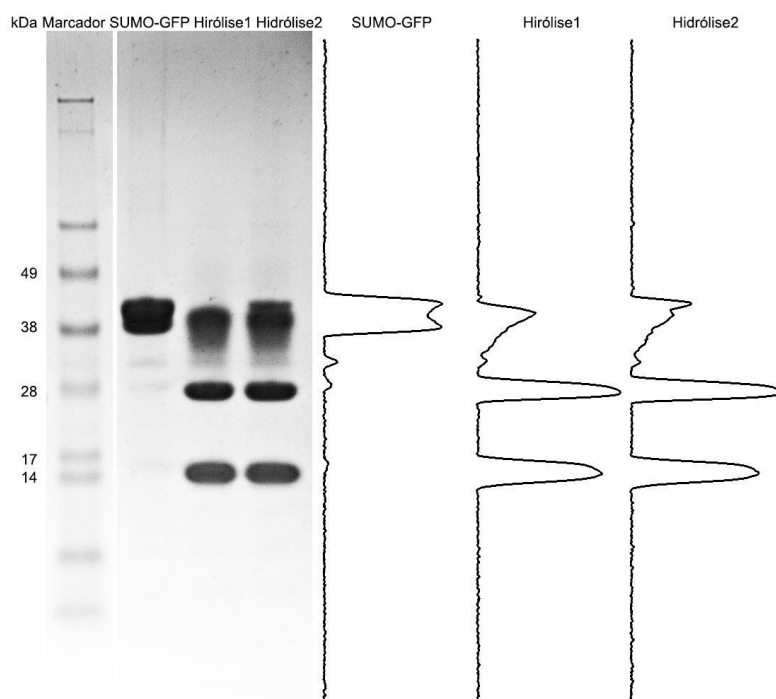


Figura 4.4 – Gel *pre-cast* NuPAGE® (Novex®) 4-12% da Invitrogen™, corrido a 160 V durante 1 hora, das hidrólises 1 e 2 e respectivas densitometrias efetuadas no programa ImageJ (NIH). Marcador de pesos moleculares SeeBlue® (Invitrogen™).

Observando o gel da **Figura 4.4**, verifica-se que a hidrólise não foi completa, já que em ambas as reações de hidrólise se observa a presença de uma banda a cerca de 40 kDa correspondente à proteína SUMO-GFP não hidrolisada. Adicionalmente, em ambas as *lanes* correspondentes às reações de hidrólise aparecem 2 outras bandas: uma a cerca de 28 kDa correspondente à GFP e outra a cerca de 14 kDa correspondente à parte da SUMO da proteína de fusão.

Pela análise das densitometrias do gel de SDS-PAGE determinou-se que 25 % da proteína SUMO-GFP não foi hidrolisada, o que significa um rendimento de 75 % nas condições testadas.

Após comprovar que a proteína purificada no laboratório apresenta atividade, testou-se a hidrólise da His₆-SUMO-PerR proveniente de duas purificações distintas, aqui denominadas fração 1 e 2.

A **Figura 4.5**, embora corresponda a um gel que notoriamente teve um problema na polimerização, refletido na resolução do gel e na coloração, evidencia uma hidrólise completa da His₆-SUMO-PerR.

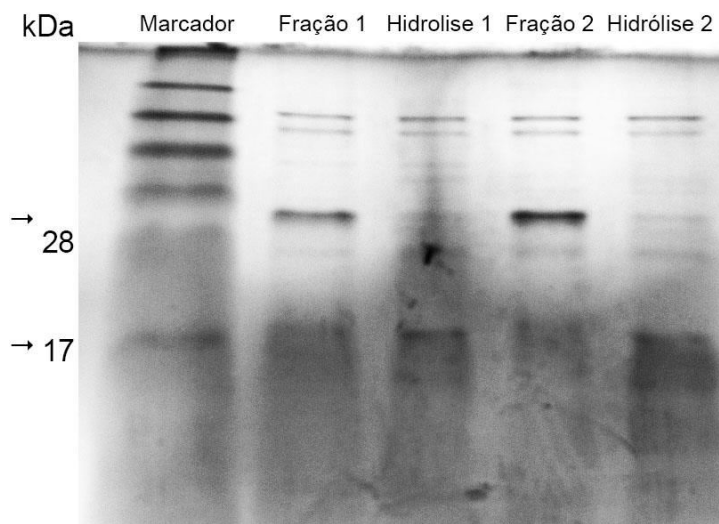


Figura 4.5 – Gel SDS-PAGE 12,5 %, corrido 1 hora a 120 V, marcador SeeBlue® (*Invitrogen*TM), da His₆-SUMO-PerR antes e depois da hidrólise. Fração 1 e 2 corresponde a amostras não hidrolisadas e hidrólise 1 e 2, ao resultado das respectivas hidrólises. As setas indicam as zonas onde se encontra a banda correspondente à proteína em estudo.

Observando o gel, nota-se uma banda mais carregada nas *lanes* que contêm proteína não hidrolisada (fração 1 e 2), um pouco acima dos 28 kDa, correspondente a His₆-SUMO-PerR. Essa banda praticamente desaparece nas *lanes* correspondentes ao resultados das reacções de hidrólise, dando lugar a um arrastamento com pouca resolução por volta dos 17 kDa – isto corresponderá à cauda His₆-SUMO que tem 12 kDa (com mobilidade eletroforética aparente de 18 kDa) e à PerR que tem 14 kDa.

Repetiu-se o gel anterior, no entanto apenas com o resultado das reacções de hidrólises, dado que as alíquotas de proteína pura não hidrolisada que havia no momento do teste foram totalmente gastas ao aplicar no gel da **Figura 4.5**.

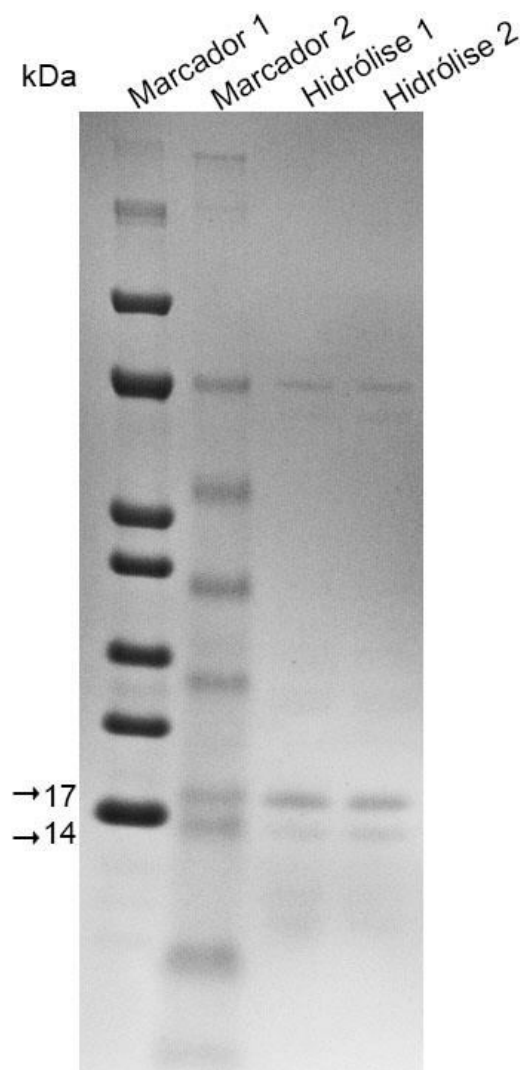


Figura 4.6 – Gel *pre-cast* NuPAGE® Novex® 4-12% (Invitrogen™), marcador LMW (NZYTech), corrido a 160 V durante 1 hora, do resultado das reações de hidrólise 1 e 2. As setas indicam as zonas onde se encontra a banda correspondente às proteínas de interesse.

O gel presente na **Figura 4.6** possui uma melhor resolução, sendo possível distinguir claramente duas bandas por volta dos 17 kDa (His₆-SUMO) e 14 kDa (PerR nativa), respetivamente.

No entanto nem tudo correu da melhor forma. Em vários ensaios não se verificou corte, nem com ULP1 purificada no laboratório, nem com ULP1 comercial. Porquê?

Muito provavelmente os inibidores de proteólise, que poderão ter acompanhado a proteína no processo de purificação e *desalting* impediram a ação da ULP1.

Por fim testou-se um último passo de purificação da PerR, como sumariamente descrito no capítulo anterior, por IMAC, pretendendo-se que apenas a cauda de Histidinas e a SUMO fiquem adsorvidas à coluna, saindo a proteína PerR nativa no passo de injeção e lavagem. No

entanto este método revelou-se ineficaz. A PerR, tanto quanto se pôde observar deste passo entra na coluna mas nunca chega a sair (dados não demonstrados). Relembro que a função da cauda de SUMO é conferir estabilidade a proteínas que facilmente se agregam e precipitam, e provavelmente terá ocorrido algum problema na estabilidade da proteína sem a cauda SUMO durante a purificação.

4.4 Conclusão

Expressou-se e purificou-se o domínio funcional da protéase ULP1 com sucesso, apresentando atividade na hidrólise de proteínas de fusão com SUMO (GFP e PerR).

Não se prosseguiu com o plano inicial de hidrolisar a His₆-SUMO-PerR e purificar a PerR devido à precipitação da PerR dentro da coluna de FPLC após separada da proteína SUMO.

Decidiu-se enveredar por uma abordagem completamente diferente – sobre-expressão seguida de solubilização e purificação de proteína a partir de corpos de inclusão (já descrita no capítulo 3) e realizar os ensaios bioquímicos com proteína de fusão.

Capítulo 5. Ensaios de ligação ao DNA

Neste capítulo são descritos os testes de ligação da His₆-SUMO-PerR a um plasmídeo no qual foi inserida a sequência promotora do gene *ahpC* de *D. vulgaris*. Os equipamentos, marcas e protocolos não explicitados estão descritos na secção de apêndices.

5.1 Planificação do ensaio e DNA utilizado

Tal como descrito na **Figura 2.7** do capítulo 2, a PerR reconhece e liga-se a uma zona de DNA no promotor dos genes por ela regulados. Em *D. vulgaris*, um desses genes codifica a proteína AhpC, que reduz peróxidos orgânicos (ver capítulo 2, **Tabela 2.1**).

Os ensaios de ligação ao DNA têm como objectivo reconhecer a interação entre a PerR e o DNA da zona do promotor do gene *ahpC*, inserido num plasmídeo. Poder-se-à, assim, estudar o comportamento da proteína em diferentes condições, podendo variar-se diversos fatores, como por exemplo:

- Presença de metais;
- Força iónica;
- Presença/ausência de oxidante.

Além dos fatores acima enumerados, existem algumas condições a ter em conta e que poderão afetar o ensaio como a temperatura e o tempo de incubação ou a razão proteína/DNA, no entanto o presente trabalho foca apenas os 3 fatores anteriores. O ensaio de ligação ao DNA, apesar de ter sido, no presente trabalho, otimizado para a His₆-SUMO-PerR, havia já sido desenvolvido aquando da expressão da PerR recombinante, no âmbito de uma outra tese de mestrado [1].

O vetor utilizado para este ensaio (representado na **Figura 5.1**) foi preparado pela Daniela Penas, por inserção no vetor comercial pUC19, de um fragmento 259 pares de bases correspondentes à zona promotora do gene *ahpC*, contendo a *PerRbox*, com a sequência repetida invertida CACAGGAATGATTCCTGTT, 100 pares de base a montante do início da sequência codificante.

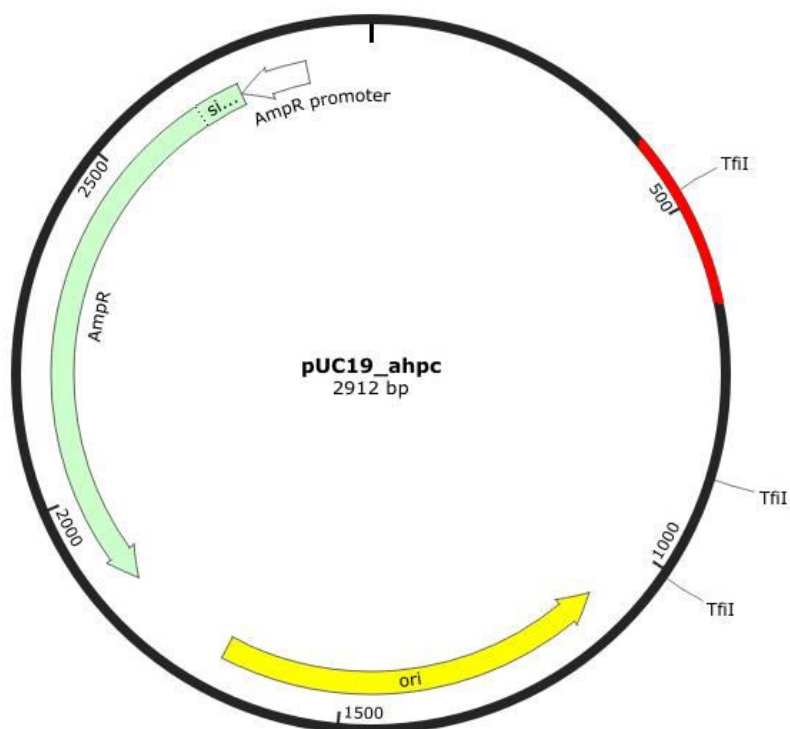


Figura 5.1 – Vetor pUC19_ahpc, utilizado nos testes de ligação da PerR ao DNA. A sequência a vermelho corresponde ao promotor do gene *ahpC* inserido no vetor pUC19.

A endonuclease de restrição Tfi I possui um local de reconhecimento precisamente na sequência da *PerRbox* apresentada (G↓ATTC). Assim, ao incubar a PerR com o vetor pUC19_ahpc e adicionar posteriormente a endonuclease Tfi I, podemos inferir sobre ligação da PerR ao DNA, através da proteção que esta confere ao DNA, relativamente à hidrólise pela endonuclease.. Existem ainda outros locais de reconhecimento da Tfi I no plasmídeo, que podem ou não ser protegidos pela PerR (tudo dependerá do quão conservados têm de ser os nucleótidos da *PerRbox*) .

Os ensaios foram realizados, numa primeira aproximação, a diferentes forças iónicas, e reconstituindo a PerR com diferentes metais, que se pensou terem afinidade para o centro regulatório (ferro, manganês e cobre). Testou-se ainda a ligação da PerR ao DNA na presença de peróxido de hidrogénio. De uma forma geral os ensaios de ligação ao DNA foram efetuados segundo o diagrama da **Figura 5.2**.

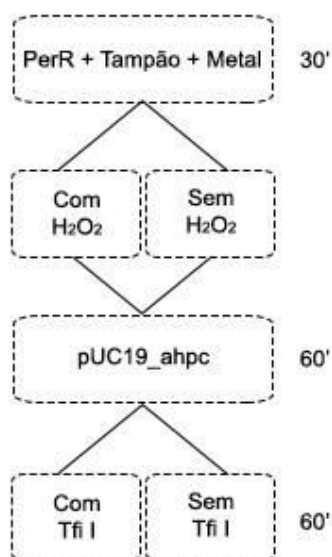


Figura 5.2 – Diagrama que explicita de forma simplificada os ensaios de ligação e períodos de incubação. A PerR é incubada 30 minutos com o metal regulatório, sendo uma fração testada com peróxido e outra sem. Ambas as frações são analisadas em gel de agarose após incubação com/sem Tfi I durante 60 minutos.

Além do processo explicitado e dos períodos de incubação, também se teve sempre em consideração os seguintes pontos ao longo dos ensaios:

- Todos os ensaios apresentados foram efetuados anaerobiamente;
- Os tampões utilizados foram tratados com resina Chelex® 100 para retirar qualquer impureza (metais);
- A água utilizada foi sempre MilliQ estéril;
- A proporção DNA-PerR foi sempre 1:1000;
- A concentração de peróxido utilizada foi de 1:1 quando o metal regulatório se encontrava em excesso e de 10:1 quando o metal regulatório era estequiométrico.

5.2 Extração de pUC19_ahpc e hidrólise com a endonuclease Tfi I

Como se pode observar na **Figura 5.1**, o pUC19_ahpc é um plasmídeo que confere às células resistência à ampicilina, a qual inibe a formação de paredes celulares levando à lise bacteriana. A resistência é conferida por transportar um gene que codifica para a β -lactamase, uma enzima que degrada a ampicilina.

As transformações, amplificações e extrações do plasmídeo foram efetuadas com células NZY5a (NZYTech) conforme os protocolos do fornecedor (apêndice 3). Na **Figura 5.3** pode ser observado DNA plasmídico extraído face ao fornecido.

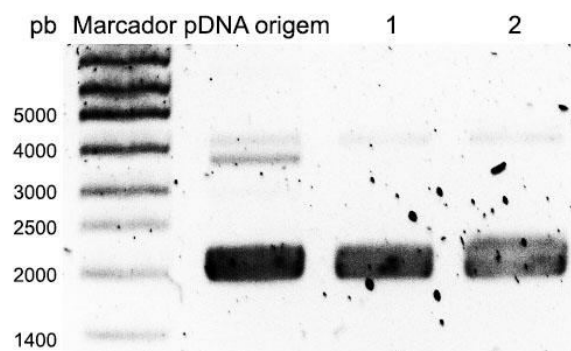


Figura 5.3 – Gel 0,8 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V com marcador NZYDNA Ladder III. Verifica-se que o plasmídeo extraído dos clones 1 e 2 têm a mesma mobilidade eletroforética que o utilizado para a transformação.

Na **Figura 5.4** podem observar-se vários espectros do DNA extraído e reconstituído em água MilliQ, com 3 fatores de diluição (100, 50 e 35 x).

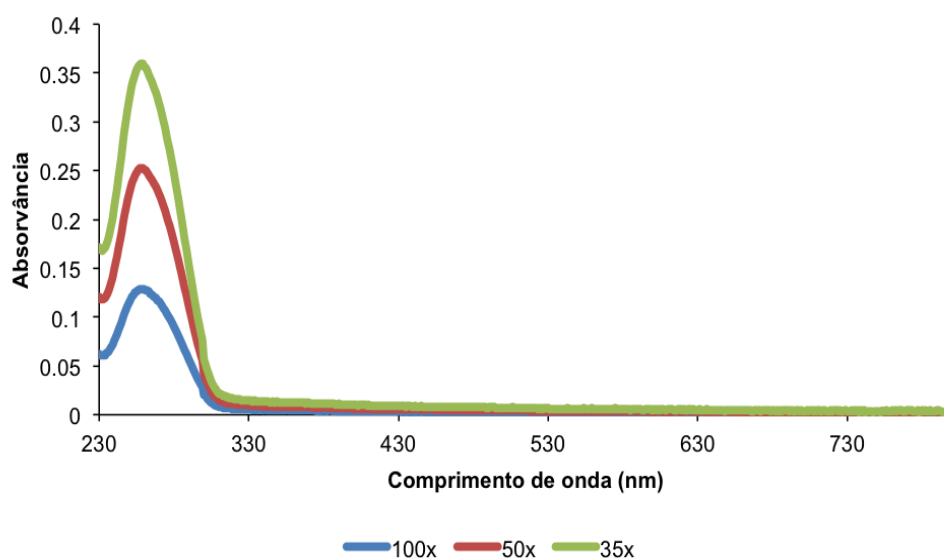


Figura 5.4 – Espectro UV-Visível do DNA do plasmídeo pUC19_ahpc diluído em água com 3 fatores de diluição diferentes.

Tabela 5.1 – Cálculo da concentração de pUC19_ahpc.¹

Fator de Diluição	A ₂₆₀ -A ₃₂₀	Concentração (µg/ml)	Mediana	Concentração (nM)
100	0,122	616,1	614,6	342
50	0,241	614,6		
35	0,342	587,1		

¹ Assumindo que 1 U A₂₆₀ de DNA em dupla cadeia corresponde a 50 µg/ml, e com o peso molecular calculado para o pUC19_ahpc (1798 kDa).

A **Tabela 5.1** descreve sumariamente a forma como se calculou a concentração de pUC19_ahpc, que, neste caso, tem 324 nM.

Depois de extraído o DNA prosseguiu-se para o teste de hidrólise com a Tfi I, segundo as recomendações do fornecedor (*BioLabs® Inc.*):

- 1 µl de enzima por cada 1 µg de DNA
- 5 µl de NEBuffer 10x
- Volume total de ensaio – 50 µl
- Temperatura de incubação de 65 °C durante 1 hora.

Na **Figura 5.5** encontra-se o resultado da hidrólise do vetor pUC19_ahpc em 3 fragmentos de 2383, 389 e 140 pares de bases.

Como se pode observar, no gel da **Figura 5.5**, o vetor hidrolisado dá origem a 3 fragmentos de DNA com uma mobilidade eletroforética muito próxima do previsto (assinalado com as setas). O fragmento mais pequeno é quase impercetível na imagem, dado que nele se intercala pouco agente corante, sendo que este não se deteta na maioria dos testes de ligação da PerR ao DNA.

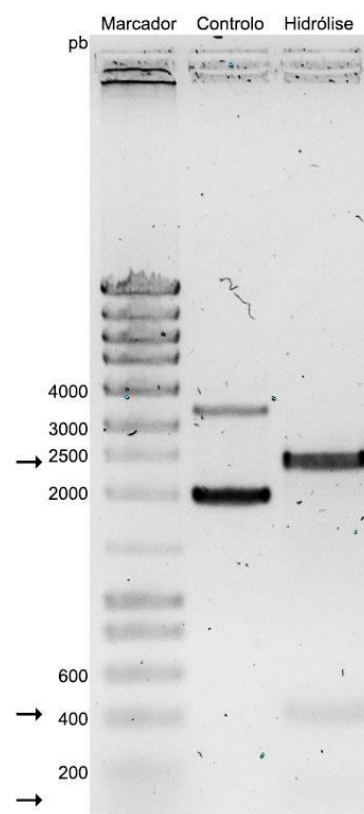


Figura 5.5 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V com marcador NZYDNA Ladder III, da hidrólise do pUC19_ahpc com a endonuclease TfiI. Controlo – controlo negativo sem adição da endonuclease. . As setas indicam as bandas resultantes da hidrólise do vetor: 2383, 389 e 140 pb, respectivamente.

5.3 Metais presentes na proteína

Os ensaios que são descritos neste capítulo são efetuados na presença de metais cofatores da PerR. Isto exige que se saiba se a proteína se encontra já na presença dos metais considerados importantes para a sua atividade: Ferro, Zinco e Manganês.

Para isso enviaram-se amostras de proteína e tampão para ICP-AES no laboratório de análises da rede de química e tecnologia (requimte), tendo-se obtido os seguintes resultados, para 1 ppm de proteína:

- Fe: 0 ppm
- Mn: 0 ppm
- Zn: 0,063 ppm

O relatório completo de análise pode ser consultado no apêndice 10. Não é surpreendente a presença de zinco visto que na primeira diálise desta proteína se adicionou 50 μ M de zinco ao tampão. No entanto acabou por não se reproduzir este método pois acabava por precipitar muito mais proteína. Ainda assim, ao longo dos ensaios de ligação ao DNA efetuados, comparou-se os resultados da proteína na presença e na ausência de zinco, não se tendo observado diferenças (apêndice 11). Deste modo decidiu proceder-se sem a adição do metal.

5.4 Efeito da força iónica no ensaio de ligação da PerR ao DNA

A His₆-SUMO-PerR utilizada nos ensaios de ligação ao DNA encontra-se num tampão com força iónica elevada (500 mM em NaCl). Isto pode ser problemático, pois pode não haver ligação da PerR ao DNA dado que estão envolvidas interações electrostáticas [2]. No entanto, sabemos de antemão que a troca de tampão por diálise contra um tampão com força iónica mais baixa (noutros trabalhos foram realizados ensaios de ligação com a proteína num tampão com NaCl apenas à concentração de 50 mM), provoca precipitação da proteína. Optou-se, assim por alterar a força iónica final da mistura reacional, adicionando tampão a diferentes concentrações por forma a variar a força iónica e determinar aquela em que se observa maior ligação da proteína ao DNA. Nestes ensaios a PerR foi reconstituída com Fe (II) em excesso e incubada durante 30 minutos em ambiente anaeróbio. Por fim adicionou-se o pUC19_ahpc e incubou-se durante uma hora. Foi utilizada água MilliQ autoclavada e os tampões foram tratados numa resina Chelex®100 da BioRad para remover iões metálicos.

Na **Figura 5.6** podem observar-se os resultados obtidos nos testes do efeito da força iónica na ligação da PerR ao DNA. Nestes ensaios não se adicionou Tfi I para simplificar, inferindo-se

sobre a ligação da PerR ao DNA através do *shift* da banda do DNA para o poço, devido à formação do complexo de elevado peso molecular PerR-DNA.

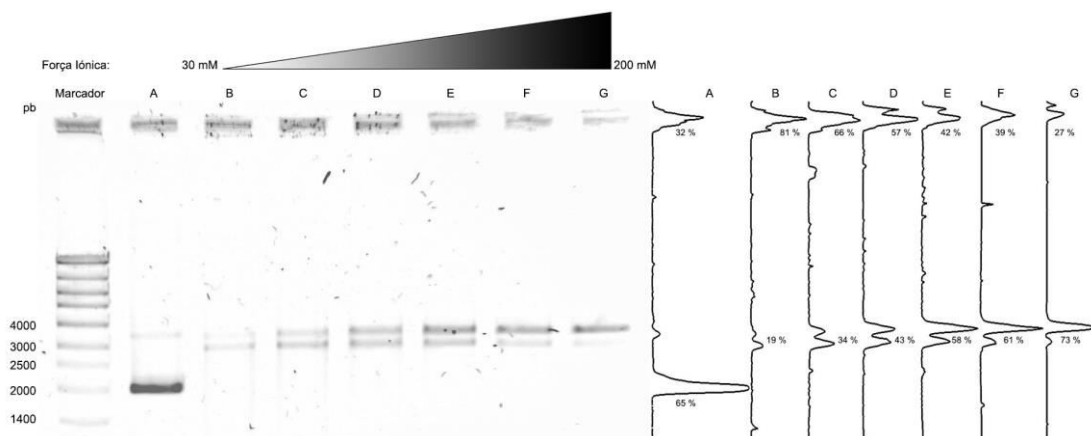


Figura 5.6 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V com marcador NZYDNA Ladder III. Em A encontra-se o controlo, de DNA sem adição de PerR em tampão com 200 mM em NaCl força iónica. De B a G encontram-se ensaios de ligação com variação da concentração de NaCl, entre 30 e 200 mM que se correlacionam com as densitometrias².

Através da observação do gel verifica-se que na presença da PerR ocorre um *shift* da banda do DNA plasmídico, passando da zona dos 2000 pb (no poço A) para a zona dos 3000 pb nos restantes poços. Esta banda poderá corresponder a uma interação entre PerR-DNA que mude a conformação do DNA de um estado superenrolado para um estado relaxado. Além desta banda existe também o aparecimento de DNA nos poços. Pelas densitometrias verificamos que com o aumento da força iónica, há um aumento de intensidade na banda a cerca de 3000 pb, e uma diminuição da densidade nos poços. Isto significa que há uma menor formação do complexo PerR-DNA com o aumento da força iónica.

Estabelece-se assim que a concentração de NaCl ideal para os ensaios de ligação será a mais baixa possível, tendo-realizado os restantes ensaios com uma concentração final de NaCl na mistura reacional de 50 mM.

² Densitometrias geradas com o ImageJ (NIH).

5.5 Ensaios de ligação da PerR ao DNA na presença de ferro

5.5.1 Controlos de DNA sem adição de PerR na presença de metais e peróxido de hidrogénio

Na **Figura 5.7** podem-se observar os controlos realizados para verificar a degradação do DNA na presença de Fe (II)/H₂O₂ ou Mn (II)/H₂O₂, na ausência da PerR e utilizados para comparação com os ensaios na presença de PerR.

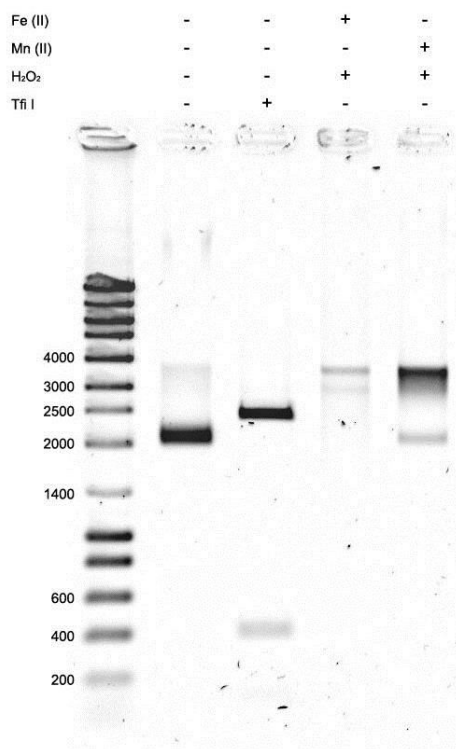


Figura 5.7 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V com marcador NZYDNA Ladder III, do pUC19_ahpc antes e depois da hidrólise com Tfi I (poços 2 e 3, respectivamente), assim como o estado do DNA na presença de Fe(II) ou Mn(II) e peróxido de hidrogénio (poços 4 e 5, respectivamente).

Como foi anteriormente explicado, é normal por vezes não se observar o fragmento mais pequeno no resultado da hidrólise com Tfi I, tal como acontece no gel da **Figura 5.7**.

Pode observar-se que no poço em que se adicionou Fe (II) e peróxido o DNA foi quase totalmente degradado devido ao ataque pelos radicais originados nas reações de Fenton entre o ferro e o peróxido de hidrogénio (**Equação 2.3**, capítulo 2). Por outro lado, na presença de Mn (II) não parece haver degradação do DNA mas sim uma alteração da sua conformação, provavelmente para uma conformação relaxada.

5.5.2 Ligação da PerR ao DNA reconstituída com excesso de Fe (II)

Na **Figura 5.8** pode observar-se o gel correspondente ao ensaio em que se reconstituiu a PerR com Fe (II) numa proporção 1:10, antes da incubação com o DNA e se comparou o efeito da presença de H₂O₂. A adição de H₂O₂ é realizada simultaneamente à adição de DNA, pelo que caso a PerR seja oxidada (de acordo com o modelo proposto) não deverá ver-se formação do complexo normalmente observável no poço dos géis de verificação dos resultados dos ensaios.

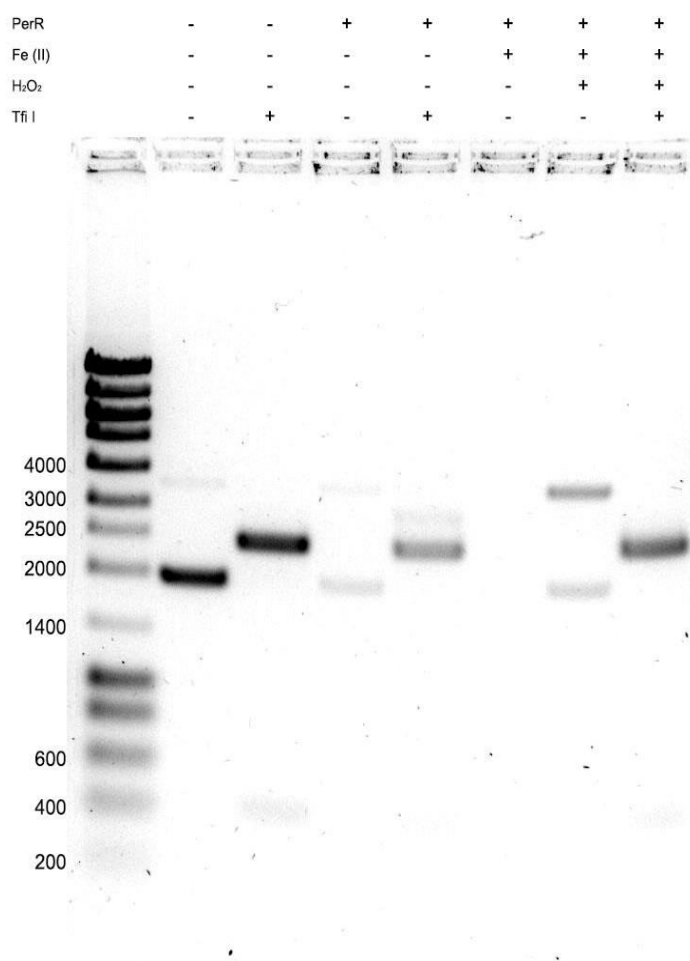


Figura 5.8 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V, com marcador NZYDNA Ladder III. Ensaios de ligação na presença de ferro em excesso (10 x), na presença e ausência de peróxido.

Pode observar-se que, embora a proteína não tenha metais regulatórios (confirmado por ICP-AES), esta retém alguma atividade sem adição de metais, como se pode ver pela presença de algum DNA nos poços 5 e 6 e uma menor intensidade das bandas presentes

respectivamente a cerca de 2000 e 2500 pb. Ainda assim é bastante evidente que na presença de Fe (II) (poço 7) não se vê qualquer banda assumindo-se que todo o DNA formou o complexo de elevado peso molecular que permanece no poço durante a eletroforese. Já na presença de peróxido de hidrogénio (poços 8 e 9), apesar de parecer haver menor quantidade de complexo PerR-DNA no poço, o DNA é protegido dos radicais formados na presença de H₂O₂, não se verificando o resultado presente no poço 4 da **Figura 5.7**. Isto verifica que a PerR na presença de peróxido de hidrogénio, liberta o DNA a que se encontrava ligado permitindo expressão dos genes que regula, parecendo no entanto manter uma função protetora do DNA contra a degradação pelos radicais.

5.5.3 Ligação da PerR ao DNA reconstituída com Fe (II) numa relação estequiométrica

Efetuuou-se o mesmo ensaio que o descrito no ponto 5.5.2, mas neste caso com uma proporção de Fe (II)/PerR 1:1 (**Figura 5.9**).

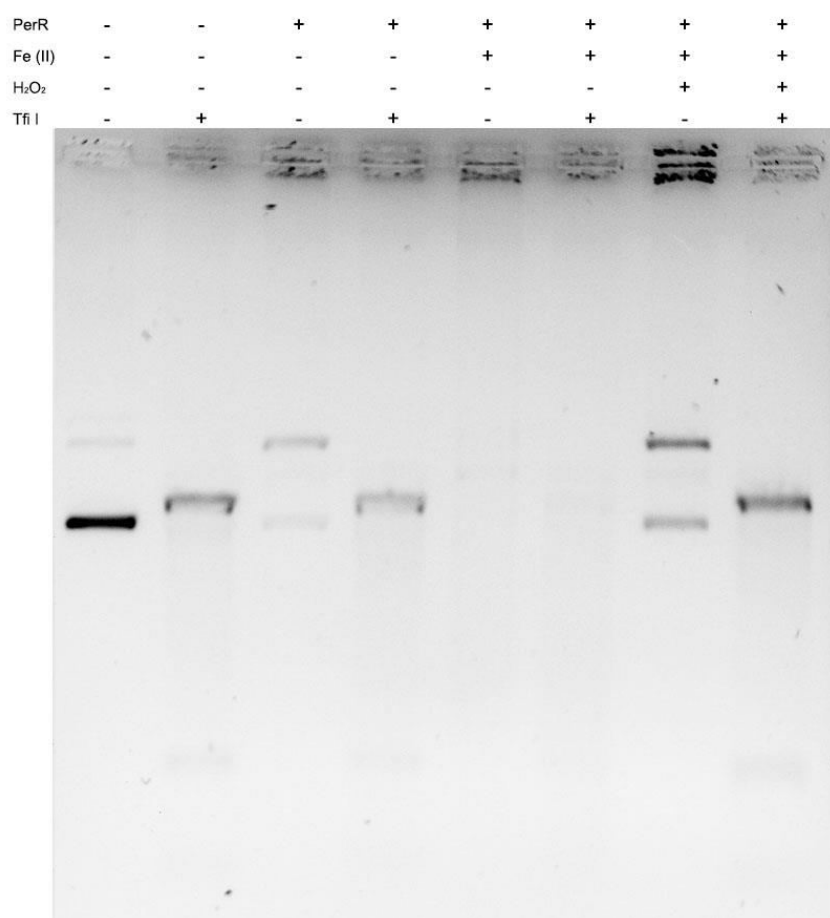


Figura 5.9 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de Fe (II) 1:1, na presença e ausência de peróxido de hidrogénio.

Através da observação do gel presente na **Figura 5.9**, verifica-se que os resultados são semelhantes aos do ensaio anterior em que a PerR foi reconstituída com excesso de Fe (II). Pode concluir-se que a PerR é activa com uma proporção de ferro 1:1, pelo que o seu centro regulatório deverá estar completamente ou quase completamente preenchido quando esta é reconstituída com uma proporção estequiométrica de Fe (II).

Neste gel em especial já é perceptível que a presença da mancha escura nos poços, correspondente ao complexo PerR/DNA que fica nos poços e não penetra no gel durante a eletroforese, varia de uma forma que nem sempre é coincidente com a presença ou ausência das bandas no gel correspondentes ao plasmídeo intacto ou hidrolisado, isto é, nos poços 5 e 6 em que não são visíveis bandas no gel, o que podemos interpretar através da formação do complexo PerR/DNA com a PerR ativa. A sombra presente nos poços é menos intensa do que nos poços seguintes (7 e 8) em que pela presença de H₂O₂, e de acordo com o modelo vigente, a PerR é oxidada, libertando o DNA (o que pode ser comprovado pelo aparecimento das bandas correspondentes ao plasmídeo circular e hidrolisado, respectivamente nos poços 7 e 8).

Nem sempre se verificou uma tarefa fácil esta identificação, pois a solubilidade da proteína altera-se na presença de metais e na mudança de força iónica, originando uma solução heterogénea em que por vezes se pipeta mais outras vezes menos, do complexo PerR/DNA.

Da experiência obtida destes resultados tornou-se necessário resolver o problema procedendo-se a uma centrifugação a 14 000 xg 15 minutos para separar o precipitado do sobrenadante. Este precipitado é então ressuspenso em 18 µl de sobrenadante e aplicado no gel de agarose com 2 µl de *blue juice* 10 x.

5.5.4 Ligação ao DNA da PerR reconstituída com excesso de Fe (III)

Para terminar os ensaios na presença de ferro, realizou-se um ensaio na presença de ferro férrico (**Figura 5.10**). Como se disse na introdução, na presença de peróxido o Fe (II) presente na PerR é oxidado a Fe (III), resultando na oxidação de um ou dois dos seus ligandos histidinas, o que provoca a saída do metal do centro regulatório, alterando a conformação da proteína e em última análise tornando-a incapaz de se ligar ao DNA. Põe-se no entanto a questão se esta saída do ferro do centro regulatório será apenas devida à oxidação das histidinas ou se o próprio Fe (III) apresentará uma baixa afinidade para se ligar à proteína. O objetivo deste ensaio foi verificar se o Fe (III) seria capaz de se ligar ao centro regulatório e se poderia restaurar a sua capacidade de ligação ao DNA, numa proteína em que não houve oxidação das histidinas e o centro regulatório se encontra intacto, capaz de ligar metais (como provam os ensaios anteriores).

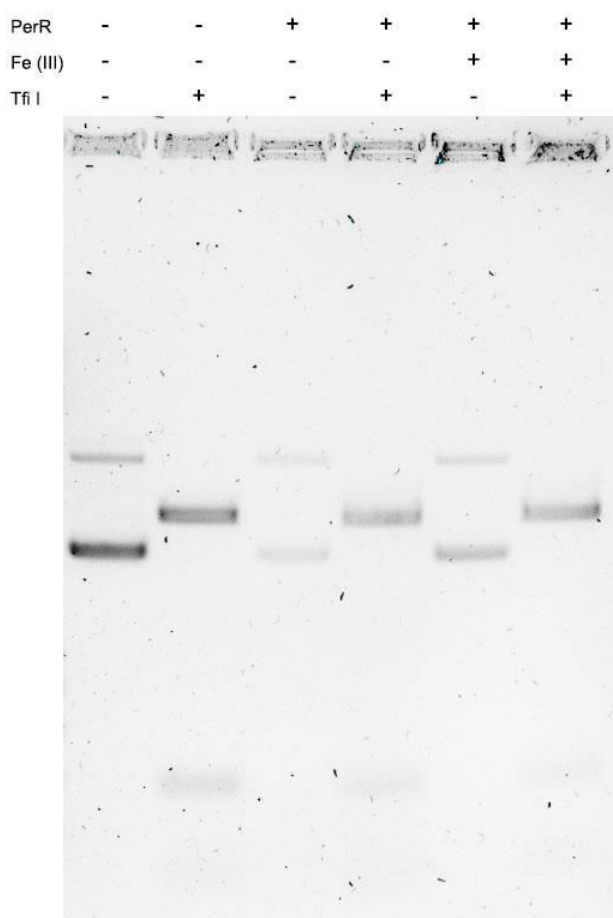


Figura 5.10 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de ferro férrico 1:10.

Pela análise do gel conclui-se que na presença de ferro férrico em excesso não ocorre proteção do corte com Tfi I, sendo portanto essencial a presença de ferro ferroso para a PerR se poder ligar ao DNA. Isto verifica que o Fe (III) possui uma baixa afinidade para se ligar ao centro regulatório da proteína, podendo significar que não é a oxidação da proteína que leva à inativação da mesma mas sim a oxidação do ferro.

5.6 Ensaios de ligação da PerR ao DNA na presença de manganês

5.6.1 Ligação ao DNA da PerR reconstituída com manganês (II) em excesso

Como anteriormente referido, está reportado que o manganês tem também um papel regulatório da proteína, tal como o ferro. Pretende-se desta forma compreender se o comportamento da PerR reconstituída com manganês em excesso é semelhante ao comportamento da PerR reconstituída com Fe (II).

Realizaram-se ensaios de ligação ao DNA com manganês em excesso, na presença e ausência de peróxido (**Figura 5.11**).

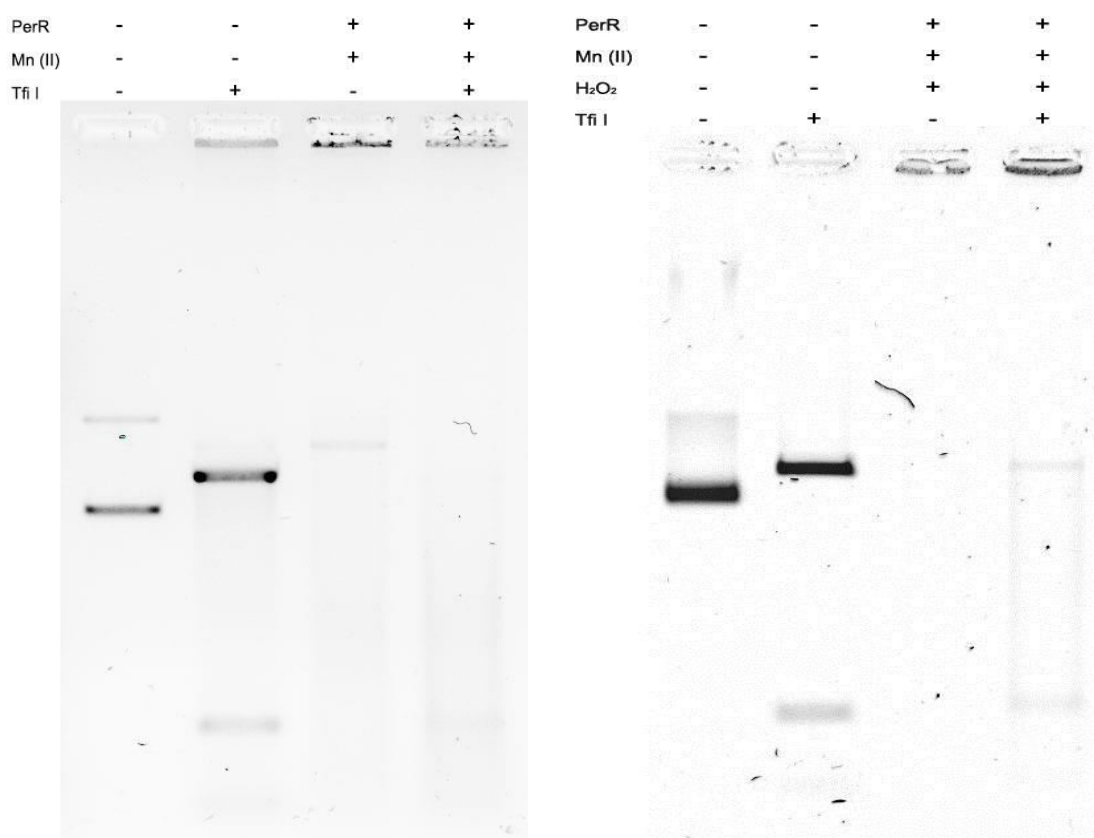


Figura 5.11 – Geis 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaios de ligação na presença de manganês 1:25, com e sem peróxido.

Na presença de manganês em excesso a PerR liga-se ao DNA protegendo-o da hidrólise com a endonuclease Tfi I, como se pode verificar nas *lanes* do gel à esquerda com PerR incubada com manganês com e sem Tfi I. Além disso, não se verifica diferença entre o ensaio com e

sem peróxido (*lanes* do gel à direita), indicando que a proteína incubada com manganês não é sensível ao H_2O_2 . Isto revela que, ao contrário do que acontece com o ferro, o H_2O_2 não oxida a proteína, ou seja, esta não é sensível ao estímulo causado pelo *stress* oxidativo, reprimindo sempre os genes que regula.

5.6.2 Ligação ao DNA da PerR reconstituída com manganês (II) numa relação estequiométrica

Da mesma forma que para os ensaios com Fe (II), fizeram-se ensaios de ligação ao DNA com PerR incubada com manganês, mas neste caso numa proporção 1:1 (**Figura 5.12**). À PerR incubada com manganês foi adicionado o DNA, deixando-se incubar 1 hora, seguindo-se a hidrólise com Tfi I.

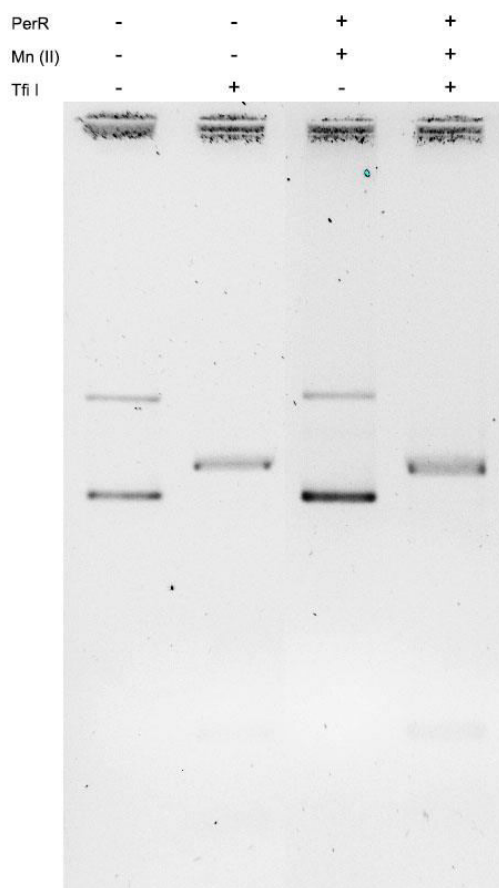


Figura 5.12 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaios de ligação na presença de manganês 1:1.

Pelo que se pode observar no gel da **Figura 5.12** não se verifica proteção do corte com Tfi I nestas condições, indicando desde já uma evidente diferença de afinidade pelo DNA imposta pela concentração do metal regulatório, quando comparado com o ensaio da **Figura 5.11**, em que se reconstitui a PerR com manganês em excesso. De igual forma, quando comparados os resultados gerais da ligação ao DNA com proteína reconstituída com ferro ou manganês, verificamos que a afinidade da proteína deverá ser maior para ferro, dado que esta apresenta atividade tanto com concentrações em excesso como estequiométricas, ao contrário do que acontece com o manganês.

5.7 Ensaio de ligação da PerR ao DNA na presença de cobre

Dado que o cobre é um metal também abundante na crosta terrestre (a par com o zinco), fez-se um ensaio de ligação ao DNA com cobre em excesso (**Figura 5.13**), por forma a verificar se esta apresenta atividade. Após incubação da PerR com o cobre, adicionou-se H_2O_2 e DNA por forma a verificar também se além de ligar ao DNA, a PerR reconstituída neste metal liberta DNA na presença de stress oxidativo.

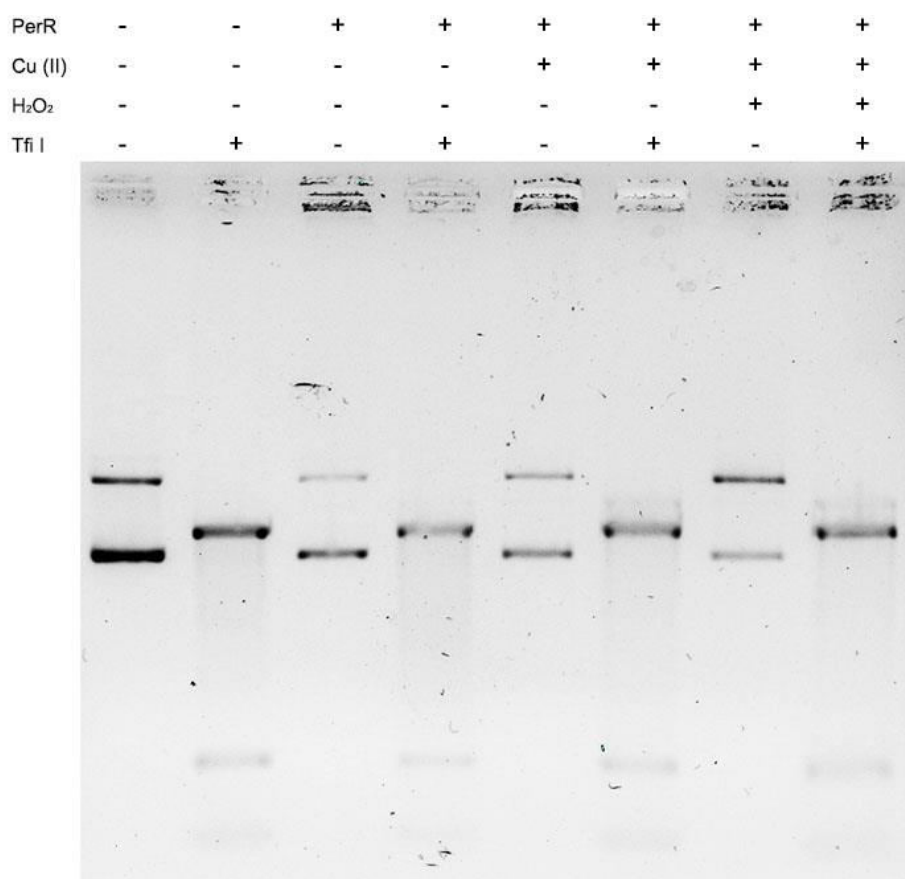


Figura 5.13 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de cobre 1:20.

Como se pode verificar no gel, os ensaios na presença e ausência de H_2O_2 e Tfi I possuem resultados muito semelhantes aos controlos (na ausência de PerR). No entanto verifica-se algum complexo PerR-DNA no poço em que não se adicionou H_2O_2 , podendo significar que existe alguma ligação ao DNA, no entanto esta não é completa nem satisfatória no que respeita à proteção do mesmo pelo corte com Tfi I.

5.8 Ensaio de ligação ao DNA da PerR purificada com EDTA e reconstituída Fe (II)

No capítulo 3 são descritas duas formas alternativas de purificação da His₆-SUMO-PerR, a primeira em que esta é eluída com imidazole, e uma segunda em que é eluída com um tampão contendo EDTA. Enquanto que as secções anteriores descreveram ensaios de ligação ao DNA da PerR purificada com imidazole, nesta secção descrevem-se os testes de ligação ao DNA da fração purificada com EDTA. Devido ao facto de o EDTA ser um poderoso quelante de metais, reconstituiu-se a PerR na presença de zinco e ferro, estando o zinco em excesso, para tentar diminuir possíveis efeitos da presença de EDTA (que deveria ser mínimo depois das diálises realizadas).

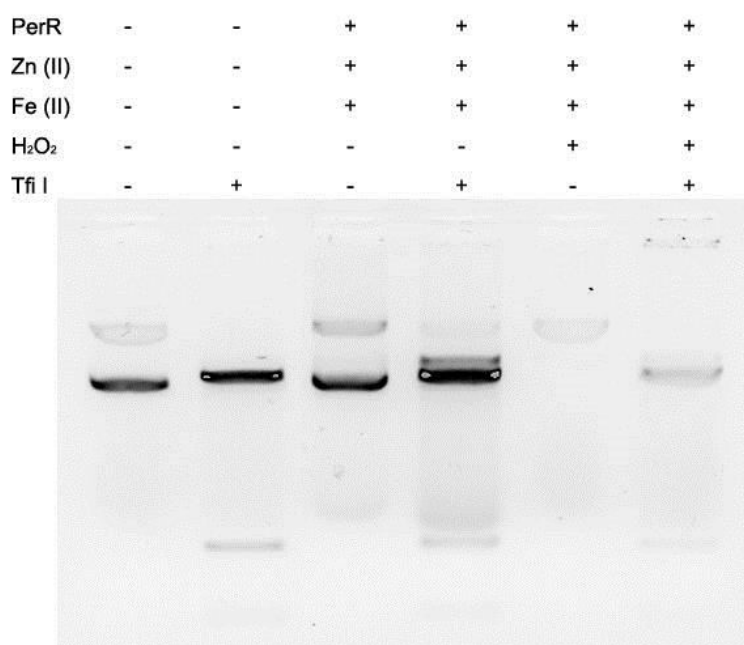


Figura 5.14 – Gel1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaio de ligação na presença de zinco em excesso e ferro 1:1.

Verifica-se pelo gel da **Figura 5.14**, que não há formação de complexo PerR-DNA em nenhum poço à semelhança dos ensaios com ferro anteriormente descritos. Além disso, na presença de Tfi I verifica-se a hidrólise do DNA à semelhança do controlo.

Na presença de H₂O₂ a PerR reconstituída com ferro não protege o DNA da degradação pelos radicais produzidos, verificando que existe ainda uma quantidade razoável de EDTA a interferir neste ensaio, dado não se terem reproduzido os resultados para a PerR purificada com imidazole.

5.9 Conclusão

Dos ensaios realizados compreendeu-se que existem diferenças na afinidade da PerR relativamente ao DNA quando incubada com diferentes metais.

Na presença de ferro em proporção estequiométrica ou em excesso, a PerR liga-se ao DNA protegendo-o da hidrólise com a Tfi I e da degradação pelos radicais gerados na presença de *stress* oxidativo. Já no caso do manganês, a PerR apenas se liga ao DNA quando reconstituída com excesso deste metal, protegendo-o da hidrólise com Tfi I. No entanto, neste caso, a PerR não liberta o DNA quando incubada com peróxido de hidrogénio. Isto indica que é a ocorrência de radicais na reação de Fenton, na presença de ferro, que provoca alterações na proteína tornando-a incapaz de se ligar ao DNA e ativando a expressão dos genes regulados. Estes resultados apoiam o modelo descrito na introdução (**Figura 2.7**). Assim parece que a PerR com manganês tem um papel exclusivamente repressor deixando de ser sensora da presença de H₂O₂ (outros mecanismos de ativação dos genes podem estar envolvidos *in vivo*).

A PerR incubada com cobre não aparenta interagir com o DNA, pelo menos no que diz respeito à proteção relativamente à hidrólise com Tfi I. As hipóteses para este resultado podem ser variadas: o cobre não liga à proteína, ou se liga esta não apresenta atividade de ligação ao DNA, pelo menos no que respeita à interação com a sequência de DNA utilizada.

A purificação de PerR com EDTA revelou que, mesmo com metais em excesso não existe ligação ao DNA, podendo significar que a diálise não é um método eficaz para remover este quelante, ou o EDTA está adsorvido à proteína.

Bibliografia

- [1] S. C. Matias, “Um Sensor de Peróxido de Hidrogénio numa Bactéria anaeróbia: A PerR de *Desulfovibrio vulgaris vulgaris* Hildenborough,” Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2010.
- [2] A. Marcovitz and Y. Levy, “Frustration in protein-DNA binding influences conformational switching and target search kinetics,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 44, pp. 17957–62, Nov. 2011.

Capítulo 6. Espectroscopia de EPR

Neste capítulo será descrita a caracterização realizada por espectroscopia de EPR da proteína His₆-SUMO-PerR incubada com os metais manganês e cobre. Os equipamentos, marcas e protocolos não explicitados estão descritos na secção de apêndices.

6.1 Caracterização da PerR incubada Mn (II) ou Cu (II)

Duas frações de proteína de fusão His₆-SUMO-PerR, com a concentração de 157 μ M de proteína monomérica em tampão 50 mM MOPS, 500 mM NaCl e 10 % glicerol foram incubadas com quantidades equimolares de manganês e cobre respectivamente, durante um período de 30 minutos a 4 °C em gelo, aerobiamente.

Estas foram transferidas para tubos de EPR de quartzo previamente calibrados, assim como apo-proteína para referência. Ainda se fizeram tubos de tampão, com e sem metais, como ponto de comparação (50 mM MOPS, 500 mM NaCl; 10 % glicerol).

Não se caracterizou através da espectroscopia de EPR a PerR incubada com Fe (III), uma vez que o espectrómetro de EPR de banda-X usado apenas permite descer a temperatura até cerca de 80 K (arrefecimento a azoto líquido), não sendo possível detetar qualquer sinal no espectro a essa temperatura. Esta limitação ocorre porque estamos na presença de uma espécie com *spin* inteiro $S = 2$, cujos dubletos apresentam degenerescência na ausência de campo magnético externo aplicado, sendo necessário arrefecer mais a amostra de forma a poder observar transições eletrónicas. Além disso, é vulgar os metais de transição com $S > 1/2$ serem silenciosos face a espectrómetros de banda-X, dado que estes não possuem energia suficiente para equivaler a separação dos níveis energéticos das transições permitidas devido ao largo *zero-field splitting* típico destas espécies.

Por outro lado, é provável que não fosse possível observar espectro de EPR mesmo a temperaturas mais baixas, caso o Fe (III) não se ligue à proteína, tal como inferido a partir dos ensaios de ligação ao DNA.

Alguns complexos de manganês ($S = 5/2$) são exceção, sendo o seu *zero-field splitting* inferior à interação de Zeeman produzida por espectrómetros de banda-X [1].

Utilizou-se um padrão de CuEDTA com uma concentração de a 3,076 mM para o cálculo das concentrações de *spin*, fornecido pela Daniela Penas. Todos os espectros foram obtidos a 80 K, utilizando um EPR de bancada, Miniscope 300, de banda-X. Outras especificações são descritas nas legendas dos espectros respectivos.

6.1.1 Caracterização da His₆-SUMO-PerR incubada com Mn (II)

Para caracterizar por espectroscopia de EPR a PerR incubada com uma quantidade estequiométrica de Mn (II), o espectro adquirido foi comparado com o espectro da PerR sem adição de Mn (II), bem como com o controle de MnCl₂ dissolvido no mesmo tampão **Figura 6.1**.

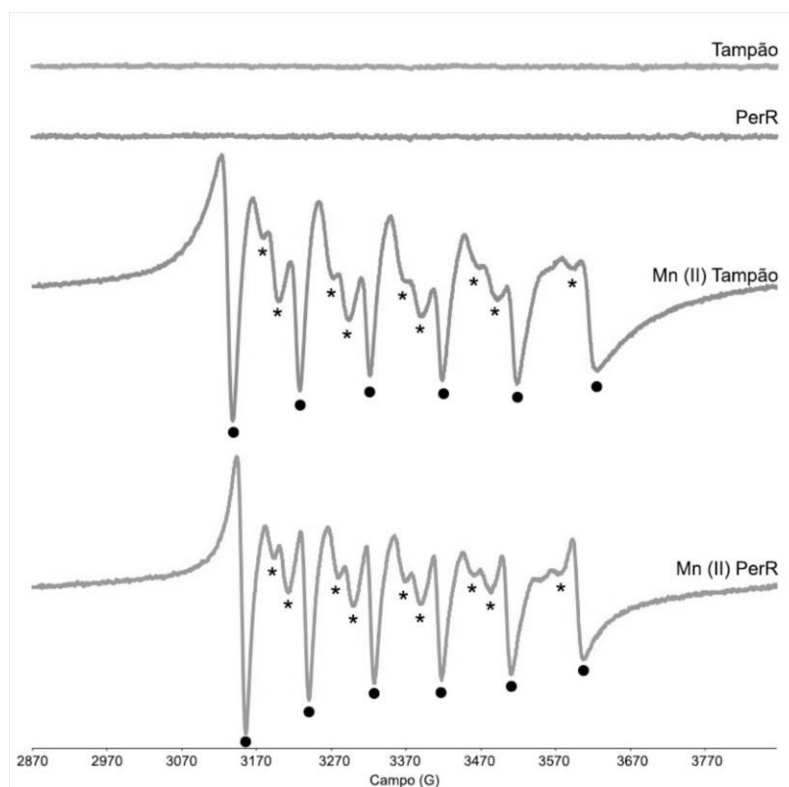


Figura 6.1 – Espectros de EPR da PerR incubada com Mn (II) (Mn (II) PerR), do controle de MnCl₂ dissolvido no mesmo tampão (Mn (II) Tampão), PerR sem adição de Mn (II) (PerR) e tampão. Marcado com (●) estão os 6 sinais hiperfinos típicos do Mn (II) e a (*) as transições proibidas. Condições experimentais: 80 K; frequência de micro-onda, 9,45 GHz; potência da micro-onda, 200 mW; modulação da amplitude, 500 mG; ganho, 200.

É descrito na bibliografia que a ligação de Mn (II) a proteínas está associada ao alargamento do sinal de EPR à temperatura ambiente [2]. Esta temperatura é bastante utilizada em biomoléculas dado que à temperatura ambiente o manganês não apresenta espectro de EPR, sendo possível titular a proteína com Mn (II) e determinar a constante de ligação à mesma. No presente caso, a 80 K, observa-se que o espectro é composto por 6 sinais típicos do desdobramento hiperfino provocado pelo *spin* nuclear do manganês $I = 5/2$. Assim terá uma multiplicidade de *spin* $M_I = 2I + 1$, ou seja 6 sinais.

Este espectro é obtido através do desdobramento de um sinal isotrópico em 6 sinais hiperfinos, igualmente isotrópicos, com origem no *spin* nuclear. Ainda se observam transições

proibidas (marcadas com * na **Figura 6.1**), caracterizadas por dupletos mal resolvidos entre os sinais, e que são observáveis pois o seu *zero-field splitting* não é nulo [2, 3].

Tanto espectro do Mn (II) livre (MnCl₂ em tampão), como no da PerR incubada com MnCl₂ em proteína observam-se 6 linhas centradas em $g = 2,00$ mas com amplitudes e intensidades sensivelmente diferentes. No entanto esta pequena diferença pode apenas dever-se a uma variação de concentração salina. De acordo com a bibliografia, o manganês, ao entrar na proteína deveria provocar um acentuado aumento da largura de linha, algo que não se verificou no presente caso [2].

Apesar de não se poder simular corretamente um espectro de EPR com transições proibidas, pode-se fazer uma aproximação em relação aos valores de A (que definem o desdobramento hiperfino entre sinais). Determinou-se que no Mn (II) em tampão, A adota valores próximos de 97 G, típicos de manganês livre em meio aquoso, ao passo que na proteína se observam valores de A por volta de 90 G, suportando as observações acima descritas.

É, portanto, muito provável que o manganês não entre na proteína nas condições descritas.

Cálculo da concentração de *spin*

Calculou-se a concentração de *spins* na amostra de proteína incubada com manganês, comparando-a com um padrão de cobre-EDTA, segundo a **Equação 6.1**.

Concentração de Spin A

$$= \frac{\text{Área}_A \times \text{Ganho}_{Cu} \times (SW_A)^2 \times \sqrt[2]{P_{Cu}} \times [Cu] \times (d_{Cu})^2 \times \text{mod}_{Cu}}{\text{Área}_{Cu} \times \text{Ganho}_A \times (SW_{Cu})^2 \times \sqrt[2]{P_A} \times [A] \times (d_A)^2 \times \text{mod}_A}$$

Equação 6.1 – Fórmula utilizada para o cálculo da concentração de *spins* de uma espécie A. SW – tamanho da janela de varrimento, P – potência ; d – diâmetro do tubo; mod – modulação.

Para se obter a área do espectro é necessário proceder a um duplo integral em função do campo aplicado. O primeiro integral permite-nos obter o espectro de EPR de absorção, uma vez que o espectro que normalmente analisamos é a sua derivada por motivos de facilidade. Assim, o duplo integral do espectro de EPR devolve a sua área, retirada do valor máximo constante obtido (**Figura 6.2**). De certa forma o segundo integral também permite verificar se a linha de base está corretamente aplicada – se esta for inadequada, o valor máximo do segundo integral não se apresenta constante ao longo do campo.

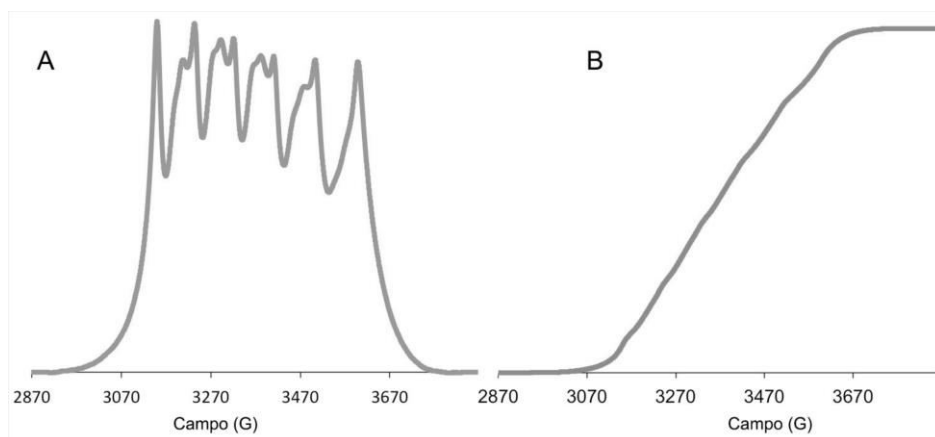


Figura 6.2 – Primeiro (A) e segundo (B) integral do espectro de EPR do manganês em proteína.

Calculou-se uma concentração de *spin* de 1,9 *spin*/Mn (II) por monômero, na proteína incubada com manganês. Dado que se utilizaram valores de concentração em monômeros, este valor significa que a maioria do manganês adicionado não ligou, dado que a área do espectro de EPR de manganês livre é maior, induzindo numa sobrestimação do valor de *spin*.

6.1.2 His₆-SUMO-PerR incubada com cobre

O espectro da PerR incubada com Cu (II) foi comparado com o espectro de tampão a que se adicionou CuSO₄.

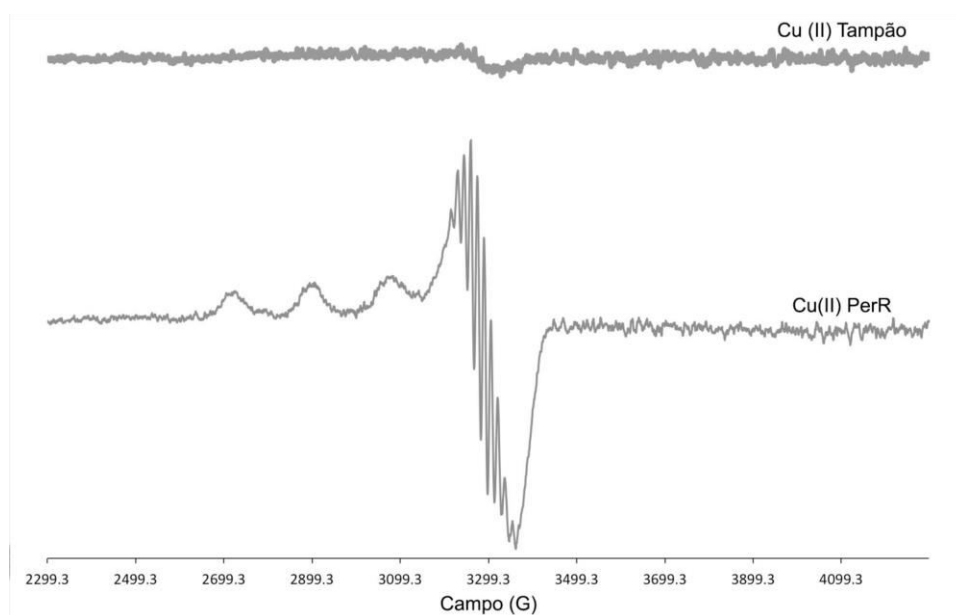


Figura 6.3 – Espectros de EPR obtidos para o cobre em tampão (Cu (II) tampão) e incubado na proteína (Cu (II) PerR). Condições experimentais: 80 K; frequência de micro-onda, 9,45 GHz; potência da micro-onda, 200 mW; modulação da amplitude, 2000 mG; ganho, 200.

O Cu (II) apresenta um *spin* nuclear $I = 3/2$, que faz com que cada sinal apresente 4 desdobramentos hiperfinos equidistantes [4]. Na **Figura 6.3** são apenas observáveis 3 desdobramentos na zona $g_{//}$ devido à sobreposição do último com o primeiro do sinal de g_{\perp} .

No presente caso é óbvio que o cobre liga à proteína uma vez que o espectro deste metal livre em tampão na ausência da proteína, mostra apenas uma sinal de intensidade bastante baixa a cerca de $g = 2$, apresentando propriedades antiferromagnéticas. Trata-se de um espectro axial em que temos $g_x = g_y < g_z$, caracterizado por uma banda de absorção derivada $g_x = g_y = g_{\perp}$ e uma banda positiva $g_z = g_{//}$.

É visível na zona correspondente ao g_{\perp} um conjunto de sinais hiperfinos que se atribuíram à interação com núcleos de azoto das histidinas que deverão ser ligandos do cobre (**Figura 6.4**). Estes possuem um *spin* nuclear $I = 1$, o que significa que por cada núcleo de azoto há um desdobramento do sinal do cobre em 3 sinais ($2I + 1$).

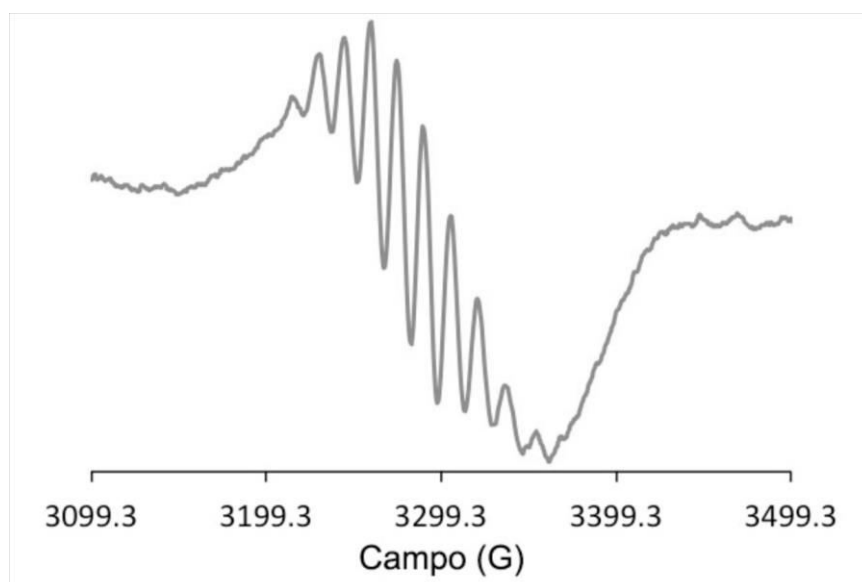


Figura 6.4 – Pormenor dos desdobramentos hiperfinos provocados pela interação com os núcleos de 3 azotos, na zona entre campo 3199 G e 3399 G do espectro de EPR da PerR incubada com Cu (II).

Foi efetuada uma simulação no programa WinEPR SimFonia por forma a determinar corretamente as constantes hiperfinas A e fatores- g e justificar o espectro através de um modelo que explique os desdobramentos hiperfinos em g_{\perp} . O modelo adotado tem como premissa a ligação de 3 azotos das histidinas, ligandos do metal do centro regulatório da proteína, ao cobre (**Figura 6.5**). Além disso, realizou-se a simulação tendo em consideração a presença de duas espécies dominantes com iguais valores de A mas diferentes valores de fator- g , que verificando-se, podem significar duas conformações da proteína com diferentes distorções no campo de ligandos ao cobre (**Figura 6.6**).

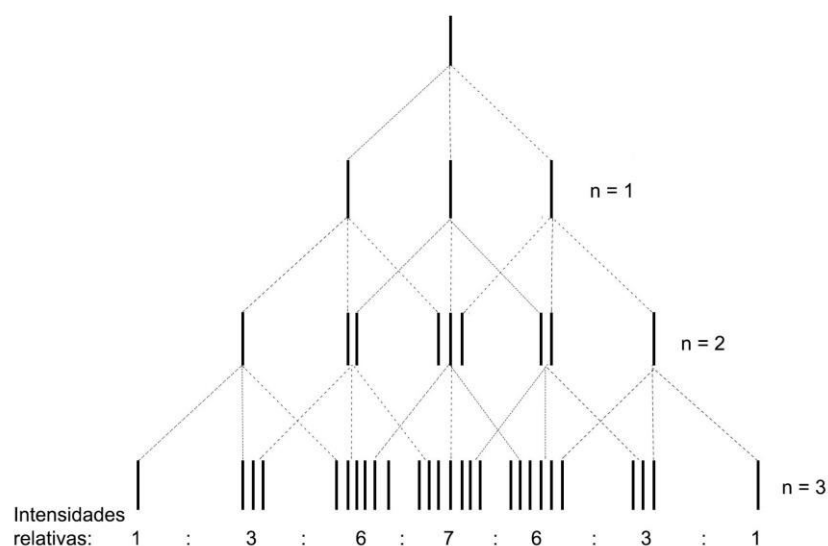


Figura 6.5 – Desdobramentos hiperfinos provocados por três núcleos $I=1$ e respectivas intensidades relativas, para valores de A constantes.

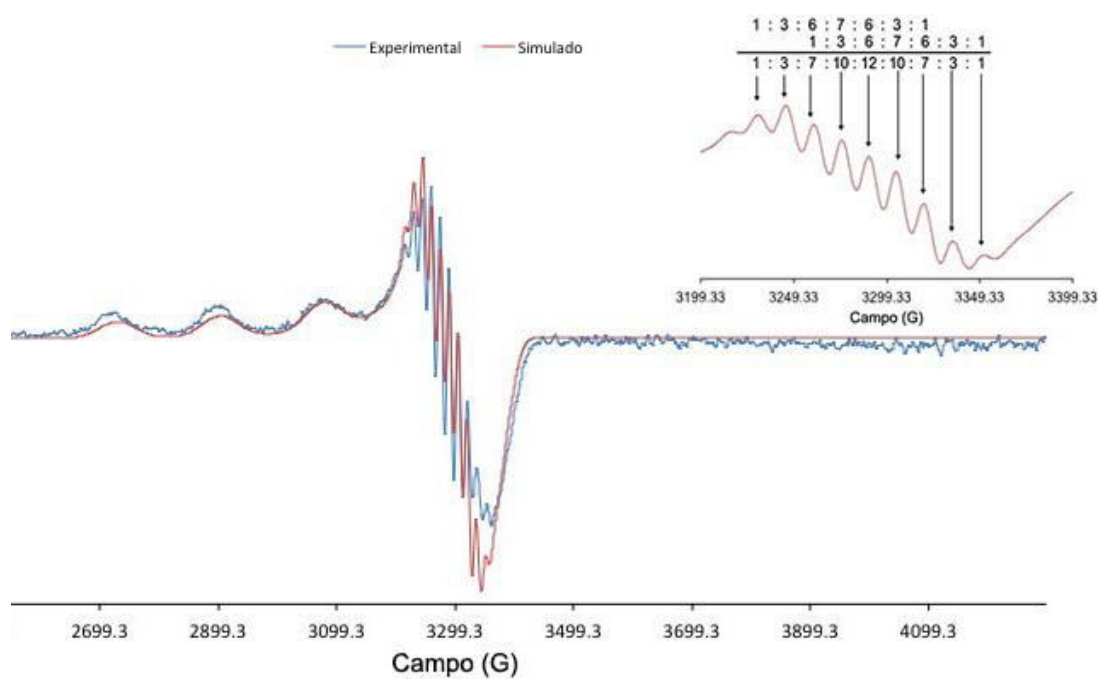


Figura 6.6 – Espectro de EPR experimental da PerR de *D. vulgaris* incubada com Cu(II), sobreposto à sua simulação segundo o modelo proposto e pormenor do modelo proposto aplicado na simulação.

Verifica-se que o modelo aplicado nas simulações é concordante com o espectro de EPR obtido, sendo os parâmetros das duas espécies consideradas apresentadas na **Tabela 6.1**.

Tabela 6.1 – Parâmetros de EPR calculados através da simulação do espectro experimental da PerR de *D. vulgaris* incubada com Cu (II).

	Parâmetro	Fator-g	Largura de linha (G)	Constantes hiperfinas A (G)	
				⁶³ Cu (II)	¹⁴ N – Histidinas
Espécie 1	x	2,0429	9,5		15
	y				15
	z	2,270	50	173	
Espécie 2	x	2,0701	9,5		15
	y				15
	z	2,250	50	173	

A PerR pode ser considerada uma proteína típica de cobre tipo II (apenas azotos e oxigênios como ligandos), sendo uma proteína incolor quando comparada com as de tipo I que possuem uma cor azul característica (devido à transferência de carga enxofre-cobre). Por outro lado as proteínas de cobre tipo III não apresentam espectro de EPR, dadas as suas propriedades antiferromagnéticas pelo acoplamento entre dois íons Cu (II). Além disso os parâmetros suportam esta observação apresentando constantes hiperfinas concordantes com as proteínas de cobre tipo II: com valores de $A_{//}$ entre 120 – 220 G; $A_{N}^{14} \sim 15$ G; $g_{//} \sim 2,3$ e $g_{\perp} < 2,1$ [1, 2, 5, 6].

Cálculo da concentração de *spin*

Calcularam-se as concentrações de *spin* para o Cu (II) na proteína comparando com um padrão fornecido, tal como foi efetuado para o manganês (**Figura 6.7**).

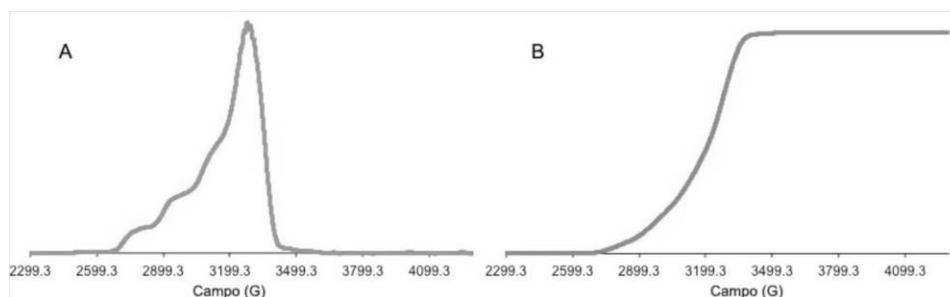


Figura 6.7 – Primeiro (A) e segundo (B) integral do espectro de EPR do cobre em proteína.

Calculou-se uma concentração de *spin* de 0,9 *spin*/Cu (II) por monómero, concordante com o previsto – 1 metal regulatório por monómero. No entanto deve-se lembrar que nos ensaios de ligação ao DNA na presença de cobre a proteína não apresenta atividade. Assim os resultados de EPR indicam que apesar de o Cu (II) parecer ligar-se no centro metálico regulatório da proteína, este não provoca a mesma alteração de conformação resultante da ligação de Fe (II) ou Mn (II). Assim a PerR incubada com Cu (II) não é ativa ou pelo menos não apresenta afinidade para a sequência de DNA com que se trabalhou.

6.2 Conclusão

A técnica de EPR revela-se muito informativa quando suportada e comparada com outros dados experimentais. O facto do manganês não parecer ligar à proteína quando incubado numa proporção 1:1 pode justificar o motivo pelo qual não se verifica ligação ao DNA nas mesmas condições.

A utilização do cobre também se revela muito informativo, sendo utilizado como sonda para confirmar os ligandos envolvidos na coordenação ao metal. Considerando a simulação do espectro experimental realizada para a PerR incubada com cobre, identificaram-se 3 resíduos de histidinas a coordenar o metal, o que seria de esperar no centro regulatório da proteína.

Ao contrário do manganês, o cobre parece ligar à PerR numa proporção aproximadamente de 1 ião Cu (II) por monómero de proteína, mas esta não apresenta atividade, suportando a hipótese de que o Cu (II) não provoca a mesma alteração de conformação para a forma fechada em que a PerR é ativa como repressora da transcrição (como ocorre com Fe (II) e Mn (II) em excesso).

Bibliografia

- [1] W. Hagen, *Biomolecular EPR Spectroscopy*, 1st ed. CRC Press, 2008, p. 248.
- [2] M. Y. Hamed and J. B. Neilands, "An electron spin resonance study of the Mn(II) and Cu(II) complexes of the Fur repressor protein.," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 53, no. 4, pp. 235–48, Mar. 1994.
- [3] D. W. Nebert and B. T. Allen, "Environmental factors influencing the hyperfine structure of manganous low-temperature electron paramagnetic resonance spectra.," *Biophys. J.*, vol. 6, no. 2, pp. 189–200, Mar. 1966.
- [4] M. J.N.Junk, *Assessing the Functional Structure of Molecular Transporters by EPR Spectroscopy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [5] M. Fittipaldi, H. J. Wijma, M. P. Verbeet, G. W. Canters, and M. Huber, "Electronic structure of the two copper sites in nitrite reductase by 9 and 95 GHz EPR on cavity mutants," *Appl. Magn. Reson.*, vol. 30, no. 3–4, pp. 417–426, Jun. 2006.
- [6] J. H. Dawson, D. M. Dooley, and H. B. Gray, "Coordination environment and fluoride binding of type 2 copper in the blue copper oxidase ceruloplasmin.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 75, no. 9, pp. 4078–4081, Sep. 1978.

Capítulo 7. Mössbauer

No presente capítulo é descrita a caracterização da His₆-SUMO-PerR incubada com ⁵⁷Fe, através de espectroscopia de Mössbauer. Os equipamentos, marcas e protocolos não explicitados estão descritos na secção de apêndices.

7.1 Condições experimentais e amostras

As amostras foram preparadas usando 400 µl de proteína a uma concentração de 840 µM. A proteína foi sempre incubada numa proporção 1:1 com os metais, anaerobiamente, por períodos de 30 minutos e posteriormente congelada em azoto líquido. Na **Tabela 7.1** encontra-se a lista das amostras realizadas.

Tabela 7.1 – Descrição das amostras realizadas para espectroscopia de Mössbauer.

Amostra	Condições de incubação
A – Controlo	Tampão (50 mM MOPS pH 7, 500 mM NaCl, 10 % glicerol) + ⁵⁷ Fe (II)
B	His ₆ -SUMO-PerR + ⁵⁷ Fe (II)
C	His ₆ -SUMO-PerR + ⁵⁷ Fe (II) + Zn (II)
D	His ₆ -SUMO-PerR + Zn (II) + ⁵⁷ Fe (II)

Todos os espectros foram adquiridos a uma temperatura de 157,7 K durante cerca de 26 horas com exceção do espectro da amostra C que foi adquirido em 62 horas.

7.2 Espectros obtidos e simulações

Na **Figura 7.1** encontram-se os espectros adquiridos de cada uma das amostras acima referidas (bolas pretas) e respectivas simulações (linhas). O tratamento dos dados assim como as simulações, foram efetuados no programa WMOSS (v2.51).

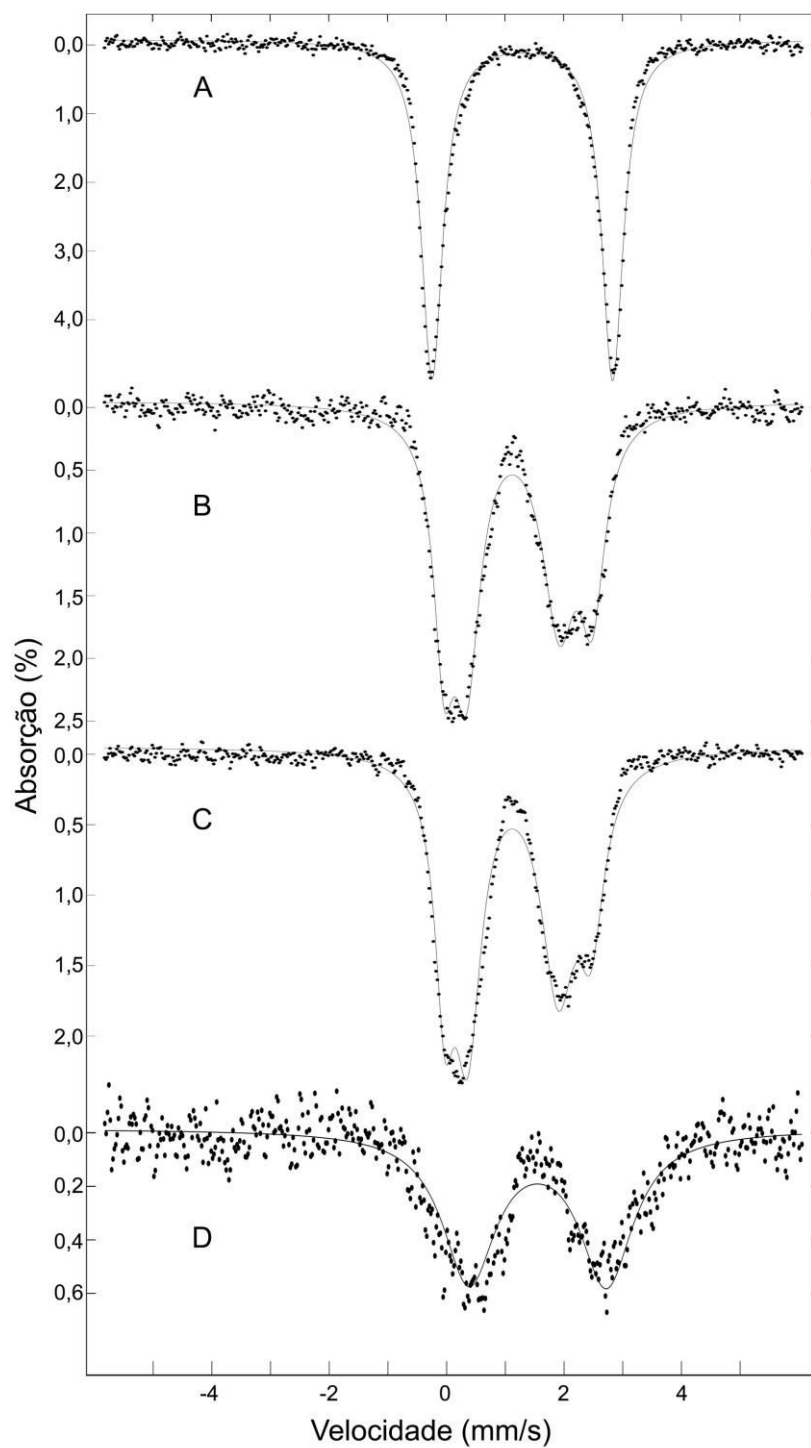


Figura 7.1 – Espectros de Mössbauer das amostras: A – Tampão + 840 μM ^{57}Fe (II); B – His₆-SUMO-PerR incubada com ^{57}Fe (II); C – His₆-SUMO-PerR incubada primeiro com ^{57}Fe (II) e depois com Zn (II); D – His₆-SUMO-PerR incubada primeiro com Zn (II) e depois com ^{57}Fe (II).

Através da simulação dos espectros de Mössbauer é possível determinar os parâmetros hiperfinos com origem na densidade electrónica sobre o núcleo de ^{57}Fe – desvio isomérico (δ), e na assimetria do campo elétrico – desdobramento nuclear de quadropolo (ΔEQ) [1, 2].

Na **Tabela 7.2** podem ser consultados os valores de ΔEQ e de δ obtidos a partir das simulações de cada um dos espectros experimentais.

Tabela 7.2 – Parâmetros hiperfinos calculados através das simulações dos espectros experimentais das amostras de His₆-SUMO-PerR incubadas com diferentes metais e do controlo de ^{57}Fe (II).

Amostra	Doblete 1		Doblete 2	
	ΔEQ (mm/s)	δ (mm/s)	ΔEQ (mm/s)	δ (mm/s)
A – Controlo	3,07	1,29		
B	2,53	1,22	1,58	1,13
C	2,49	1,22	1,54	1,13
D	2,34	1,55		

Após análise e simulação do espectro B, foram efetuadas amostras de Mössbauer incubadas com zinco devido ao facto de se ter verificado que o espectro da proteína incubada só com Fe (II) possuía dois dobletos maioritários, provavelmente devido a diferentes conformações menos estáveis da proteína na ausência de zinco.

A amostra A, trata-se de um controlo, com parâmetros típicos de ^{57}Fe ferroso em tampão, como seria de esperar, com um ΔEQ elevado.

Pela observação dos desvios isoméricos, todos os dobletos apresentam características de ferro ferroso de *spin* alto ($S=2$). O facto de os desvios isoméricos dos dobletos das amostras B e C apresentarem valores inferiores em relação ao da amostra D pode ser indicativo de um número de coordenação inferior a este, possivelmente penta-coordenado [3, 4].

Observamos também que a ordem de incubação com zinco é de extrema importância na obtenção da conformação correta da proteína. Os espectros C e D indicam que a ordem de adição dos metais é de extrema importância. Os parâmetros hiperfinos não se alteram significativamente ao incubar His₆-SUMO-PerR com zinco após incubação previa com ferro (amostra C). No entanto, quando se incuba primeiro a PerR com Zn e só então com ^{57}Fe não só existe alteração dos parâmetros hiperfinos como o espectro passa a ser constituído apenas por um dobleto, o que parece indicar uma conformação mais estável.

Determina-se, assim, o dobleto de quadropolo presente no espectro da proteína His₆-SUMO-PerR incubada com Fe (II) possui um desdobramento de quadropolo de aproximadamente 2,34 mm/s, um valor muito diferente do determinado para a o ⁵⁷Fe na PerR de *B. subtilis* (3,05 mm/s), sendo que seria de esperar que ambas as proteínas possuísem uma esfera de coordenação idêntica [5]. No entanto, na referida bibliografia os autores verificaram a presença de duas espécies no espectro: uma delas em menor quantidade – 13 %, que atribuiria à conformação mais estável da proteína, com um ΔEQ de 2,30 mm/s e a outra com um ΔEQ de 3,05 mm/s. Os autores têm a proteína em diferentes conformações, e admitem que a percentagem maioritária corresponde à conformação de interesse.

Também se prepararam amostras para análise através da espectroscopia de Mössbauer em que se adicionou excesso de zinco e ferro 1:1 à proteína His₆-SUMO-PerR purificada pelo método descrito como alternativo – com EDTA (Figura 7.2).

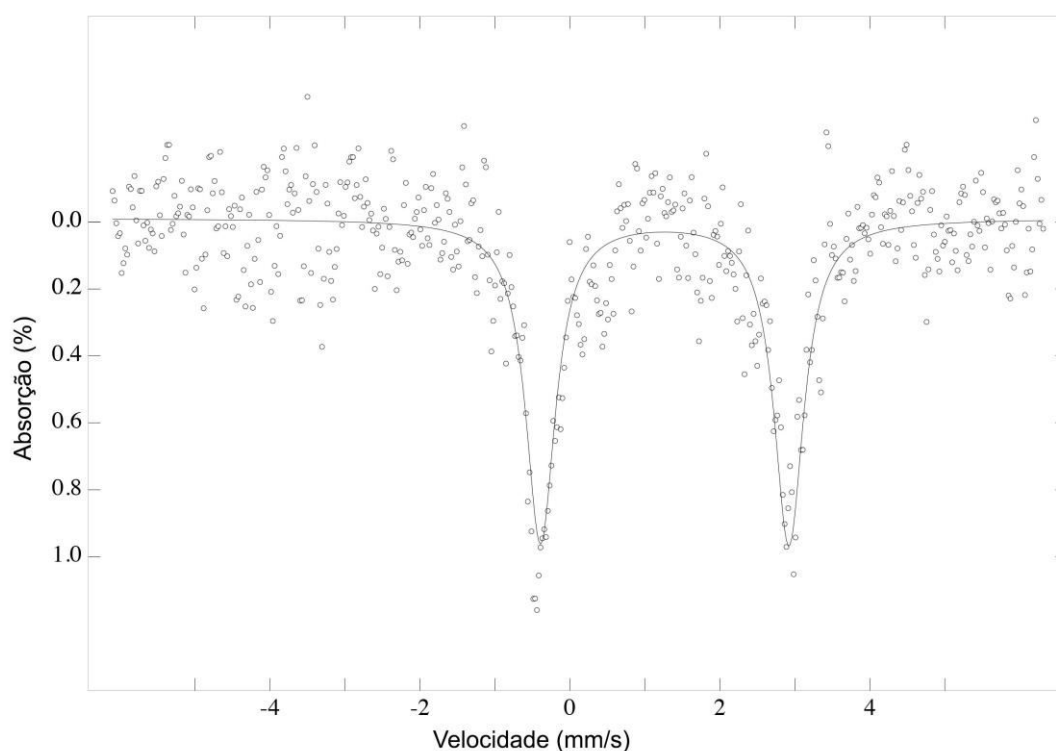


Figura 7.2 – Espectro de Mössbauer obtido da His₆-SUMO-PerR purificada com EDTA, incubada com excesso de Zn (II) e 1:1 com ⁵⁷Fe (II).

Da simulação calculou-se que o ferro tem um ΔEQ de 3,31 mm/s um δ de 1,26 mm/s, concordante com os valores conhecidos de Fe (II) – EDTA em Mössbauer [6]. Isto é um forte indicador de que o ferro está quelado pelo EDTA, impedindo o acesso da proteína a este por forma a adotar a conformação ativa.

7.3 Conclusão

Conclui-se que há uma intrínseca importância em incubar a proteína com zinco, obrigatoriamente antes de incubar com ferro para os ensaios realizados *in vitro*. É possível que *in vivo* o mecanismo de entrada dos metais para a proteína também seja efetuado segundo a mesma ordem.

Estes resultados também estão de acordo com o determinado para EPR com cobre (sem adição de zinco), dado que se detetaram duas espécies maioritárias com conformações diferentes, embora semelhantes, no que respeita aos compostos de coordenação ao metal regulatório.

Há poucas referências bibliográficas de compostos modelo idênticos para o sistema em estudo. No único artigo com Mössbauer de uma proteína homologa à PerR de *D. vulgaris* conseguiu-se identificar um dobleto concordante com o determinado neste trabalho, embora os autores não o tenham considerado relevante.

Por fim, conclui-se que a purificação com EDTA não é eficaz para os ensaios realizados, visto que é difícil remover este quelante, acabando por interferir sempre com os metais regulatórios da proteína.

Bibliografia

- [1] B. Fultz, *Characterization of Materials*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2002.
- [2] Y. Yoshida and G. Langouche, *Mössbauer Spectroscopy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [3] P. Gülich, E. Bill, and A. X. Trautwein, *Mössbauer Spectroscopy and Transition Metal Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [4] D. a K. Traoré, A. El Ghazouani, S. Ilango, J. Dupuy, L. Jacquamet, J.-L. Ferrer, C. Caux-Thang, V. Duarte, and J.-M. Latour, “Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*,” *Mol. Microbiol.*, vol. 61, no. 5, pp. 1211–9, Sep. 2006.
- [5] A. Parent, C. Caux-Thang, L. Signor, M. Clémancey, R. Sethu, G. Blondin, P. Maldivi, V. Duarte, and J.-M. Latour, “Single glutamate to aspartate mutation makes ferric uptake regulator (Fur) as sensitive to H₂O₂ as peroxide resistance regulator (PerR).,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 52, no. 39, pp. 10339–43, Sep. 2013.
- [6] A. Marton, N. Sükösd-Rozlosnik, A. Vértes, I. Nagy-Czakó, and K. Burger, “Mössbauer and EPR spectroscopic study of the iron-EDTA system,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 137, no. 3, pp. 173–176, Aug. 1987.

Capítulo 8. Conclusão

Foi desenvolvido um protocolo para a expressão, solubilização a partir de corpos de inclusão, purificação e concentração da PerR enquanto uma proteína de fusão com a proteína SUMO e uma cauda de 6 histidinas. Desta forma provou-se ser possível obter frações de proteína pura com uma concentração na ordem de 1 mM, o que permite a preparação de amostras para analisar através da espectroscopia de Mössbauer.

Dos ensaios de ligação ao DNA compreendeu-se que a proteína se comporta de diferentes formas dependendo do metal repressor escolhido. Na presença de ferro, equimolar ou em excesso, a proteína protege o DNA da degradação por peróxido de hidrogénio e da hidrólise com a endonuclease Tfi I, que corta o DNA do promotor da AhpC na sequência de reconhecimento da PerR (*PerRbox*). Por outro lado, quando se reconstituiu a PerR com Mn, só na presença de um grande excesso deste metal, a proteína consegue proteger o DNA. Já na presença de cobre não há evidências de existir ligação ao DNA.

A espectroscopia de EPR permitiu compreender o motivo pelo qual a PerR reconstituída com manganês 1:1 não protege o DNA da enzima de restrição – a maior parte do manganês adicionado não se liga à proteína, continuando em solução, o que faz com que nem todos os centros presentes na amostra estejam preenchidos, e consequentemente, nem todas as moléculas estejam na conformação ativa (fechada). Além dos metais anteriores reconstituiu-se ainda a PerR com cobre para tentar por simulação do espectro de EPR tentar verificar quais os resíduos envolvidos na ligação deste metal à proteína, perceber a qual dos 2 centros se liga e tentar perceber se este metal poderia ser uma alternativa ao ferro em caso de crescimento do organismo em meio deficitário neste último.

Verificou-se a ligação do cobre a um centro contendo 3 resíduos histidina de acordo com as simulações efectuadas – possivelmente o centro catalítico que liga Fe/Mn. No entanto, os resultados dos ensaios de ligação ao DNA da PerR com Cu (II) permitem inferir que a forma PerR-Cu pode não ser fisiologicamente relevante.

Verificou-se também por EPR a existência de duas espécies maioritárias de proteína incubada com cobre. Isto também é observável por Mössbauer, tendo-se concluído que a incubação com o metal estrutural (zinco) é importante para obviar este problema. A ordem de incubação também se revelou importante *in vitro*, devendo a proteína ser primeiro incubada com zinco.

Ainda assim os resultados dos ensaios de ligação ao DNA não sofreram alterações em consequência da não adição da falta de metal de estrutural, já que se utilizou sempre proteína em excesso e porque alguma proteína tem zinco, de acordo com o ICP.

Capítulo 9. Trabalho futuro

Como em todos os trabalhos, há sempre um plano além do que se pode realizar no tempo que se tem disponível. Será de grande importância continuar a estudar o papel do ferro na proteína por Mössbauer e EPR, em particular na presença de *stress* oxidativo, tentando compreender se realmente surge algum radical que inviabilize a proteína, como reportado, ou se é possível propor outro modelo que não implique a degradação da proteína após oxidação.

Apêndice 1. Instrumentação

1.1. Balanças

Foram utilizadas duas balanças, uma semi-analítica, *Acculab*, e analítica, CP224S, da *Sartorius*.

1.2. Centrifugação

Centrifugação de volumes superiores a 1 ml: centrífuga *Z 36 HK (HERMLE)*, com um rotor de ângulo fixo *221.21 V01*.

Centrifugação de volumes inferiores a 1 ml: micro-centrífuga *Sigma 1-14 (Sartorius)*.

Ultracentrifugação: ultracentrífuga *Optima LE-80K (Beckman Coulter)*, com um rotor de ângulo fixo 70 Ti

1.3. Diálises e concentração de proteína

Foram utilizadas fitas de diálise com 12-14 kDa de *cut-off* (*Visking, Medicell International Ltd*), e gel absorvente *Spectra/Gel Absorbent (SpectrumLabs)*.

1.4. Disrupção celular

A disrupção celular foi feita com um sonicador *LABSONIC® M (Sartorius)*. Os ciclos necessários à sonicação são descritos no texto, assim como a amplitude e período de sonicação.

1.5. Esterilização

A esterilização do material de laboratório e meios de crescimento microbiano foi efetuado numa autoclave Labo Autoclave (Sanyo).

1.6. Eléctrodo de pH

Para confirmar pH de soluções e tampões utilizou-se o medidor de pH *Basic 20 (Crison)*.

1.7. Electroforeses

As eletroforeses de SDS-PAGE cujos géis foram polimerizados foram efetuadas no aparelho *BIO-RAD mini-PROTEAN® Tetra System*. Utilizou-se também o aparelho *Amersham ECL Gel horizontal electrophoresis system* no caso das eletroforeses com géis pré-polimerizados de gradiente 8 a 16%.

As eletroforeses em gel de agarose foram efetuadas numa tina *msmini* da *Cleaver scientific*.

1.8. Espectrômetro de EPR

Foi utilizado um espectrômetro de EPR *MiniScope 300 (Magnetech)*.

1.9. Espectrômetro de Mössbauer

O espectrômetro de Mössbauer utilizado faz uso de uma fonte de radiação γ de cobalto 57, utilizando como referência espectro de uma folha de ferro metálico adquirido à temperatura ambiente. Os espectros de proteína foram obtidos a 157 K com o auxílio de um criostato de circuito fechado (*Janis*).

1.10. Espectrofotômetros

Foram utilizados dois espectrofotômetros para traçar espectros de varrimento ou a comprimentos de onda discretos em ensaios de quantificação: *Evolution 300 e 201 (Thermo Scientific)*.

Para a leitura de densidades ópticas utilizou-se um espectrofotômetro de comprimento fixo a 600 nm *Ultrospect 10 (Amersham Biosciences)*.

Células de quartzo (*Hellma*).

1.11. Filtração

A filtração dos tampões utilizados foi efetuada com filtros de 0,45 μm de poro (*GVS*) com um funil magnético (*Pall*).

1.12. Incubadoras

Os crescimentos microbianos foram efetuados em incubadoras com agitação orbital *Ovan (Alfagene)*.

1.13. Purificação por IMAC

Os testes de purificação da PerR foram efetuados numa coluna pré-empacotada His-Trap de 5 ml (*GE Healthcare*), arrefecida em gelo, e as purificações e *refolding* numa resina empacotada numa coluna arrefecida com uma camisa de água refrigerada. As colunas foram acopladas a um HPLC (*AKTATM prime plus*).

1.14. Transiluminadores e câmera

As fotografias dos géis de SDS-PAGE foram efetuadas com recurso a um transiluminador de luz branca (*Uvitec*) e as dos géis de agarose com um transiluminador UV *Safe ImagerTM 2.0 Blue-Light (Invitrogen)*. Ambos com um câmera *Gel Logic 100, Imaging System (Kodak)*.

Apêndice 2. Antibióticos, Meios de Cultura

2.1. Antibióticos

A escolha de transformantes nos meios sólidos e o crescimento dos clones em meio líquido é assistido pelas marcas de resistência a determinados antibióticos.

Tabela 2.1 – Concentração dos antibióticos utilizados.

Vetor	Antibiótico	Concentração (µg/ml)
pET28a_SUMO_PerR	Canamicina	50
pUC19_ahpc	Ampicilina	100

2.2. Meio Lysogeny Broth (LB)

Tabela 2.2 – Meio LB e a sua composição.

Composição	Concentração (g/l)	Marca
Triptona	10	NZYtech
Extrato de levedura	5	
Cloreto de Sódio	10	
Agar ¹	12	

2.3. Meio 2x Yeast extract and Tryptone (2xYT)

Tabela 2.3 – Meio 2xYT e a sua composição.

Composição	Concentração (g/l)	Marca
Triptona	20	BD
Extrato de levedura	10	Panreac
Cloreto de Sódio	20	Panreac (99,5%)

¹ O agar só está presente quando se pretende fazer crescimento em meio sólido.

Apêndice 3. Protocolos de transformação e extração de DNA

3.1. Transformação de células competentes *E. coli* DHY5α e BL21 (NZYTech)

- 1) Descongelar as células em gelo e separar 100 µl para a reação;
- 2) Adicionar 2 a 5 µl de DNA plasmídico (10 a 100 ng DNA) a 50 µl de células competentes e misturar suavemente;
- 3) Incubar em gelo durante 40 minutos;
- 4) Incubar a 42 °C durante 30 segundos, sem agitar;
- 5) Transferir imediatamente para gelo e incubar durante 2 minutos;
- 6) Adicionar 900 µl de meio de cultura LB;
- 7) Incubar numa incubadora com agitação orbital, a 37 °C, 225 rpm, durante 1 hora;
- 8) Plaquear diferentes volumes (25, 50, 100 e 200 µl) do produto de transformação em placas de LB- agar e antibiótico conforme o vector utilizado e incubar durante 16 a 18 horas a 37 °C.

Nota: É feito controlo negativo (sem adição do vetor), ao mesmo tempo que se transforma. Pontos 1, 2, 6 e 8 são efectuados em condições de assepsia.

3.2. Isolamento de DNA plasmídico NZYMidiprep (NZYTech)

- 1) Sedimentar 25 – 30 ml de cultura de células de *E. coli* NZY5α, contendo o plasmídeo que se pretende isolar num tubo falcon de 50 ml através de centrifugação a 6 000 xg durante 10 minutos a 4 °C, eliminando o sobrenadante;
- 2) Ressuspender as células em 4 ml de solução M1 (tampão com RNase) e agitar no vortex;
- 3) Adicionar 4 ml de solução M2 (lise alcalina) e agitar por inversão os tubos 5 vezes. Incubar à temperatura ambiente durante 2 – 3 minutos sem agitar;
- 4) Neutralizar a solução, adicionando 4 ml de solução M3 (contém hidrocloreto de guanidina) e agitar invertendo o tubo 10 – 15 vezes. Centrifugar durante 45 minutos a 11000 xg;
- 5) Equilibrar a coluna fornecida (*NZYTech Plasmid Midi Column*) com 2,5 ml de solução MEQ;
- 6) Aplicar o lisado na coluna e deixar a mesma esvaziar por gravidade;
- 7) Lavar a coluna com 10 ml de tampão MW e deixar a mesma esvaziar por gravidade;
- 8) Eluir o DNA plasmídico com 5 ml de tampão ME a 50 °C para um tubo de recolha limpo;
- 9) Adicionar 3,5 ml de isopropanol para precipitar o DNA. Misturar bem e incubar 2 minutos à temperatura ambiente;
- 10) Centrifugar 30 minutos a 12000 xg a 4 °C e descartar cuidadosamente o sobrenadante;
- 11) Adicionar 2 ml de etanol 70 % e centrifugar 5 minutos a 12000 xg a 4 °C. Descartar cuidadosamente o sobrenadante;
- 12) Secar o etanol do tubo e ressuspender em 200 – 500 µl de água MilliQ autoclavada.

Apêndice 4. Protocolo de Sobre-Expressão e Purificação de His₆-SUMO-PerR

4.1. Sobre-expressão em BL21(DE3)

- 1) Transformar células competentes BL21(DE3) *NYTech* com o plasmídeo pET28a_SUMO_PerR extraído de fresco. Plaquear em meio LB agar com canamicina 50 µg/ml e incubar 16 horas a 37 °C;
- 2) Selecionar uma colônia das placas e inocular, com a ansa, 5 ml de meio LB com canamicina 50 µg/ml, e incubar 8 horas a 37 °C a 220 rpm;
- 3) Transferir 1 ml do crescimento anterior para um balão de Erlenmeyer com 100 ml de meio LB com canamicina 50 µg/ml, e incubar 16 horas a 37 °C a 220 rpm;
- 4) Inocular 20 ml do crescimento anterior em 1 l de meio LB com canamicina 50 µg/ml. Incubar a 37 °C a 220 rpm e induzir com 0,1 mM IPTG quando se atingir uma densidade ótica a 600 nm de 0,5. Após 3 horas de sobre-expressão, centrifugar a 10000 xg, 10 minutos a 9 °C para separar as células do meio, e ressuspender o *pellet* em 25 ml de tampão 50 mM Pi pH 7,0, 100 mM NaCl e 1 mM EDTA. Guardar na câmara a -80 °C.

4.2. Purificação da proteína His₆-SUMO-PerR por *refolding* em coluna com resina *His-Trap GE Healthcare*

- 1) Fazer 3 ciclos de congelação e descongelação, e adicionar uma ponta de espátula de DNase I *Invitrogen*TM, deixando-se incubar >30 minutos em gelo;
- 2) Fazer em seguida 10 ciclos de sonicação de 3 minutos com 100 % de potência por forma a garantir que as células ficam partidas;
- 3) Adicionar uma ponta de espátula de DNase I *Invitrogen*TM;
- 4) Centrifugar a 10000 xg, 10 minutos a 9 °C, separando-se o sobrenadante do *pellet* (proteína insolúvel);
- 5) Ressuspender o *pellet* em 20 ml de *Binding Buffer* (50 mM Pi pH 7,0; 500 mM NaCl; 20 mM imidazole; 1 mM β-mercaptoetanol; 6 M ureia);
- 6) Fazer 3 ciclos de sonicação como anteriormente descrito e incubar à temperatura ambiente com agitação durante 60 minutos;
- 7) Centrifugar a 10000 xg, 10 minutos a 9 °C, separando-se o sobrenadante;
- 8) Ultracentrifugar a 118000 xg, 60 minutos a 4 °C, separando-se o sobrenadante, e filtrar com um filtro de seringa de 0,45 µm.
- 9) Preparar os seguintes tampões:
 - *Binding Buffer*:

- 50 mM Pi pH 7,0;
- 500 mM NaCl;
- 20 mM imidazole;
- 1 mM β -mercaptoetanol;
- 6 M ureia.
- *Refolding Buffer*:
 - 50 mM Pi pH 7,0;
 - 500 mM NaCl;
 - 20 mM imidazole;
 - 1 mM β -mercaptoetanol.
- *Elution Buffer*:
 - 50 mM Pi pH 7,0;
 - 500 mM NaCl;
 - 500 mM imidazole;
 - 1 mM β -mercaptoetanol;
 - 10 % glicerol.

- 10) Equilibrar a coluna *His-Trap GE Healthcare* com tampão *Binding Buffer*;
- 11) Injetar o sobrenadante a 1 ml min^{-1} , e lavar a coluna com *Binding Buffer* recolhendo-se num Erlenmeyer a fração de proteína que não agarrar à resina;
- 12) Após estabilização da absorvância, iniciar um gradiente de *Refolding Buffer* (0-100%) até um total de 4 volumes de coluna (80 ml no presente caso);
- 13) Após estabilização da condutividade eluir a proteína agarrada à resina com 80 ml de *Elution Buffer*;
- 14) Verificar por SDS-PAGE quais as frações recolhidas mais ricas em proteína;
- 15) Juntar as frações selecionadas e proceder a 3 diálises de 60 minutos contra 5 l de tampão *metal free* 50 mM MOPS pH 7,0, 500 mM NaCl, 10 % glicerol;
- 16) Centrifugar a 12000 xg, 30 minutos a 9 °C, separando-se o sobrenadante da proteína precipitada;
- 17) Verificar por UV-visível o espectro da proteína e quantificar com base no seu coeficiente de extinção molar;
- 18) Congelar em frações de 3 ml na câmara a -80 °C.

Apêndice 5. Protocolo de Sobre-Expressão de ULP1

- 1) Plaquear as células em meio LB agar com canamicina 50 µg/ml e incubar 16 horas a 37 °C;
- 2) Selecionar uma colônia das placas e inocular, com a ansa, 5 ml de meio LB com canamicina 50 µg/ml, e incubar 8 horas a 37 °C a 220 rpm;
- 3) Transferir 1 ml do crescimento anterior para um balão de Erlenmeyer com 100 ml de meio LB com canamicina 50 µg/ml, e incubar 16 horas a 37 °C a 220 rpm;
- 4) Inocular 10 ml do crescimento anterior em 1 l de meio LB com canamicina 50 µg/ml. Incubar a 37 °C a 170 rpm e induzir com 0,8 mM IPTG quando se atingir uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. Após 3,5 horas de sobre-expressão, centrifugar a 10000 xg, 10 minutos a 9 °C para separar as células do meio, e ressuspender o *pellet* em 10 ml de tampão 20 mM Pi pH 7,9, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazole, 0,1 % Triton x-100. Guardar na câmara a -80 °C.
- 5) Fazer 3 ciclos de congelação e descongelação, e adicionar uma ponta de espátula de DNase I *Invitrogen*TM, deixando-se incubar >30 minutos em gelo;
- 6) Fazer em seguida 6 ciclos de sonicação de 3 minutos com 80 % de potência por forma a garantir que as células ficam partidas;
- 7) Adicionar uma ponta de espátula de DNase I *Invitrogen*TM;
- 8) Centrifugar a 10000 xg, 10 minutos a 9 °C, separando-se o sobrenadante do *pellet*;
- 9) Ultracentrifugar a 118000 xg, 60 minutos a 4 °C, separando-se o sobrenadante, e filtrar com um filtro de seringa de 0,45 µm.

Apêndice 6. Eletroforeses

6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

A **Tabela 6.1** indica as soluções necessárias para a preparação das amostras, dos géis de poliacrilamida e tampão de corrida.

Tabela 6.1 – Soluções utilizadas em SDS-PAGE.

Solução	Composição	Marca	Quantidade	Observações
I Tampão de corrida do gel	2,5 M Tris Base	<i>Trizma® base Sigma Aldrich 99,9%</i>	30,3 g	pH 8,8 – 9,0
	37 % HCl	<i>Scharlau</i>	Até pH 8,8	
	H ₂ O	Não aplicável	Até 100 ml	
II Tampão de concentração do gel	0,5 M Tris Base	<i>Trizma® base Sigma Aldrich 99,9%</i>	6,06 g	pH 6,6 – 6,8
	37 % HCl	<i>Scharlau</i>	Até pH 6,8	
	H ₂ O	Não aplicável	Até 100 ml	
III Acrilamida/Bisacrilamida (30:0,8)	Acrilamida	<i>Bio-Rad</i>	Não aplicável	
	Bisacrilamida			
	H ₂ O	Não aplicável	Até 100 ml	
IV 10% SDS	SDS	<i>NZYtech 99%</i>	10 g	
	H ₂ O	Não aplicável	Até 100 ml	
V 10% PSA	Persulfato de amónio	<i>Bio-Rad</i>	0,5 g	Preparar antes de usar
	H ₂ O	Não aplicável	Até 5 ml	
VI Tampão Tris-Glicina	0,25 M Tris base	<i>Trizma® base Sigma Aldrich 99,9%</i>	30,30 g	pH 8,3 Diluir 1:10 antes de usar
	1,92 M Glicina	<i>Sigma Aldrich 99,7%</i>	144,1 g	
	SDS	<i>NZYTech 99%</i>	10 g	
	H ₂ O	Não aplicável	Até 1000 ml	
<i>Sample Buffer (SB)</i>	Solução II	Não aplicável	5 ml	
	10% SDS	<i>NZYTech</i>	8 ml	
	β- mercaptoetanol	<i>Sigma Aldrich</i>	1 ml	
	Glicerol	<i>Sigma Aldrich 98%</i>	2 ml	
	Azul de bromofenol	<i>Riedel-de Haën</i>	4 mg	
	H ₂ O	Não aplicável	Até 20 ml	

Faz-se um tratamento desnaturante das amostras, antes de aplicar nos géis, adicionando um determinado volume de tampão das amostras conforme a **Tabela 6.2**.

Tabela 6.2 – Volume de amostra e de SB a aplicar no gel.

Amostra	Volume de amostra (µl)	Volume de SB (µl)
Sobrenadante	5	5
<i>Pellet</i>	5	25
Fracionamento celular	5	25
Teste de crescimento	1,2/D.O.600 = volume (ml) que é preciso centrifugar; juntar SB ao <i>pellet</i>	50

Depois de adicionar o SB às amostras estas devem ser fervidas durante 5 minutos ou, no caso dos *pellets*, até este desaparecer.

A Tabela 6.3 indica as soluções utilizadas na preparação dos géis de poliacrilamida. Os dois últimos reagentes (V e TEMED), são aplicados imediatamente antes da polimerização do gel. Os géis são corridos a 120 V durante 1,5 horas.

Tabela 6.3 – Volume das soluções necessárias à preparação dos géis de poliacrilamida.

Solução	Gel de concentração 5% acrilamida (ml)	Gel de corrida 12,5% acrilamida (ml)
I		0,75
II	0,45	
III	0,3	2,08
IV	0,018	0,05
H₂O	0,94	2,1
V	13,5 µl	38 µl
TEMED (NZYTech)	2 µl	2,5 µl

As figuras **Figura 6.1**, **Figura 6.2** e **Figura 6.3** representam os marcadores de pesos moleculares: *LMW* e *Marker II* da *NZYTech* e *SeeBlue®* da *Invitrogen*, utilizados no presente trabalho.

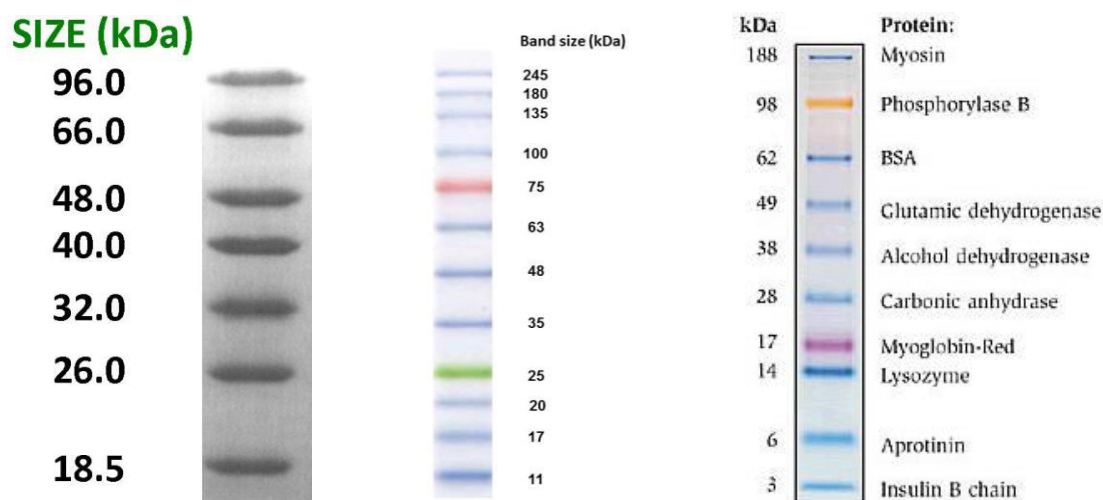


Figura 6.1 – Marcador de pesos moleculares *LMW* da *NZYTech*.

Figura 6.2 – Marcador de pesos moleculares *Marker II* da *NZYTech*.

Figura 6.3 – Marcador de pesos moleculares *SeeBlue®* da *Invitrogen*.

Para possibilitar a visualização das bandas nos géis de SDS-PAGE é necessária fazer uma coloração, neste caso com azul de coomassie, durante 30 minutos. Após a coloração é necessária uma descoloração para remover o excesso de corante. A Tabela 6.4 indica as soluções constituintes do corante e do descorante.

Tabela 6.4 – Soluções corante e descolorante para os géis SDS-PAGE.

Solução	Composição	Marca	Quantidade
Corante	Azul coomassie R-250	<i>Sigma Aldrich</i>	1 g
	Ácido acético glacial	<i>Sigma Aldrich</i>	15 ml
	Metanol	<i>Carlo Erba 99,9%</i>	90 ml
	H ₂ O	Não aplicável	Até 200 ml
Descorante	Ácido acético glacial	<i>Sigma Aldrich</i>	75 ml
	Metanol	<i>Carlo Erba 99,9%</i>	450 ml
	H ₂ O	Não aplicável	Até 1000 ml

6.2. Electroforese em gel de agarose

6.2.1. Preparação do gel

- 1) Preparar a concentração desejada de agarose (0,8 – 1,0%) em tampão TAE;
- 2) Verter a agarose no tabuleiro do gel e colocar o pente ainda com a agarose líquida;
- 3) Deixar solidificar à temperatura ambiente;
- 4) Retirar com cuidado o pente da agarose e colocar o gel no aparelho de electroforese;
- 5) Mergulhar o gel em tampão TAE.

6.2.2. Aplicação das amostras

- 1) Pipetar para tubos *ependorf* distintos, 2 µl da mistura de DNA plasmídico, 5 µl de marcador de pesos moleculares e 18 µl da reação de ligação ao DNA. Adicionar a cada um BlueJuice™ numa razão 1:1;
- 2) Aplicar as amostras e marcador nos poços do gel pipetando todo o volume da amostra;
- 3) Ligar a fonte de alimentação e regular a voltagem para 100 V. A electroforese deverá decorrer durante cerca de 1 hora;
- 4) Desligar a fonte e retirar o gel do aparelho. Mergulhar o gel em SYBR® Safe, e aguardar 30 minutos;
- 5) Observar o gel no transiluminador (de iluminação UV de comprimento de onda curto);
- 6) Fotografar o gel.

A **Figura 6.4** e a **Tabela 6.5** representam os marcadores de pesos moleculares e a lista de materiais e reagentes utilizados, respectivamente.

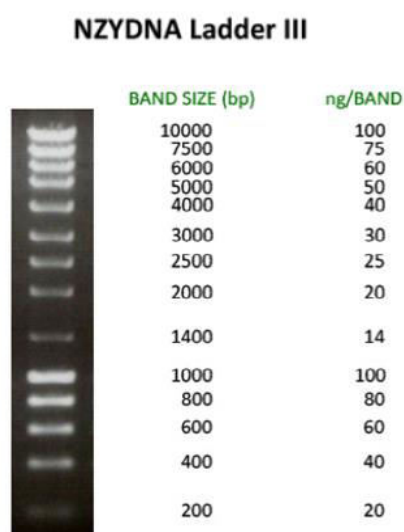


Figura 6.4 – Marcador de pesos moleculares dos *NZYDNA Ladder III*.

Tabela 6.5 – Lista de reagentes e materiais.

Reagente	Marca
Agarose	<i>NZYTech</i>
SYBR® Safe	<i>Invitrogen</i>
Tampão TAE	Não aplicável
BlueJuice™ 10x	<i>Life Technologies™</i>

Apêndice 7. Hidrólise do vetor de pUC19_ahpc

A hidrólise do vetor pUC19_ahpc foi realizada com a enzima de restrição Tfi I, durante 1 hora a 65 °C, como indicado na **Tabela 7.1**.

Tabela 7.1 – Tabela com os volumes de componentes a adicionar para se proceder à hidrólise.

Componente	Volume (µl)
Tampão MOPS (500 mM)	1
pUC19_ahpc (50 – 556 nM)	1 – 0,5
Tampão <i>CutSmart</i>	5
Tfi I	0,2
H ₂ O MilliQ	Até 50 µl

A concentração do pUC19_ahpc foi obtida pela medição da absorvância a 260 nm da amostra diluída no espectrofotômetro. Considerou-se que cada unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 50 ng/µL de DNA e que o vetor tem uma massa molar de 1798 kDa.²

² Calculado com a ferramenta SnapGene 2.2.2

Apêndice 8. Sequência da proteína de fusão His₆-SUMO-PerR

Sequência da proteína de fusão: sequência com His₆ – a **vermelho**, sequência da SUMO a **azul** e sequência da PerR de *D. vulgaris* a **verde**.

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTT
PLRRLMEAFQKRQKEMDSLRFYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGGATY**MSQT**
RMTKQRMVILEELRKVDTHPTADEIYAMVRSRIPRISLGTVYRNLDLLAESGEILRLEAAGTQ
KRFDGNTMHHQHVRRCGRVGDVMHPLDVPQPERAAAKGFTILTARVEFEGICDHCTAHS

Cálculo pela ferramenta ExPASy ProtParam da massa molecular espectável para a proteína His₆-SUMO-PerR assim como o seu coeficiente de extinção molar (ϵ) a 280 nm:

- Massa molar = 28 kDa
- $\epsilon_{280\text{nm}} = 6210 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Apêndice 9. Quantificação de proteína por BCA

A quantificação de proteína foi efetuada de acordo com o protocolo de fornecedor (*G-Biosciences*).

- 1) Pipetar 50 μ l de cada padrão e amostra a analisar para um *eppendorf*;
- 2) Adicionar 1 ml de *working solution* a cada *eppendorf* e misturar no vortex;
- 3) Incubar a 37 °C durante 30 minutos;
- 4) Arrefecer os tubos até à temperatura ambiente e transferir 1 ml para uma cuvette;
- 5) Medir as absorvâncias a 562 nm contra água como referência;
- 6) Subtrair a absorvância média do ensaio branco (sem proteína padrão), e determinar a concentração das amostras com a curva de calibração.

Apenas se alterou o protocolo no que respeita à concentração e quantidade de amostras para construção da curva de calibração (**Figura 9.1**).

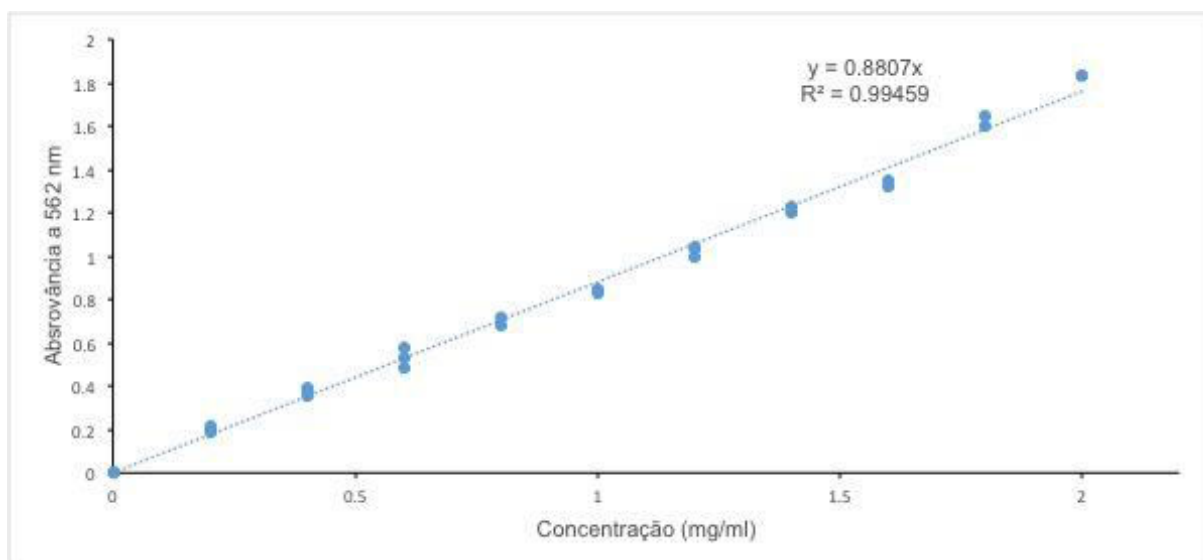


Figura 9.1 – Curva de calibração obtida pelo método de BCA fornecido.

Da leitura das absorvâncias das amostras, determinou-se que se tem uma concentração média de His₆-SUMO-PerR de 1,4 mg/ml. Dado que sabemos que o peso molecular da proteína é exatamente 25753,3 Da, calcula-se uma concentração de 54,1 μ M, permitindo a construção do gráfico de coeficientes de extinção molar *versus* absorvância, com o auxílio do espectro da proteína.

Apêndice 10. ICP

LABORATÓRIO DE ANÁLISES

Serviço de Espectroscopia de Emissão Atômica



Operador: Carla Rodrigues / Lab. Análises REQUIMTE

Submetido por: Dr.^a Cristina Timóteo / Depto. Química

Responsável: Dr.^a Cristina Timóteo / Depto. Química

Req. Interna: 14-I091

Data Análise: 18/03/14

Tempo de análise: 30 min

Resultado da Análise

Amostra	Int Fe	Fe (mg/l)	Int Mn	Mn (mg/l)	Int Ni	Ni (mg/l)	Int Zn	Zn (mg/l)
1	98087	0.000	95564	0.000	149109	0.027	706629	0.075
2	98662	0.001	94004	0.000	126789	0.008	221145	0.012

A TÉCNICA

Carla Rodrigues

LABORATORIO DE ANALISES

Serviço de Espectroscopia de Emissão Atômica

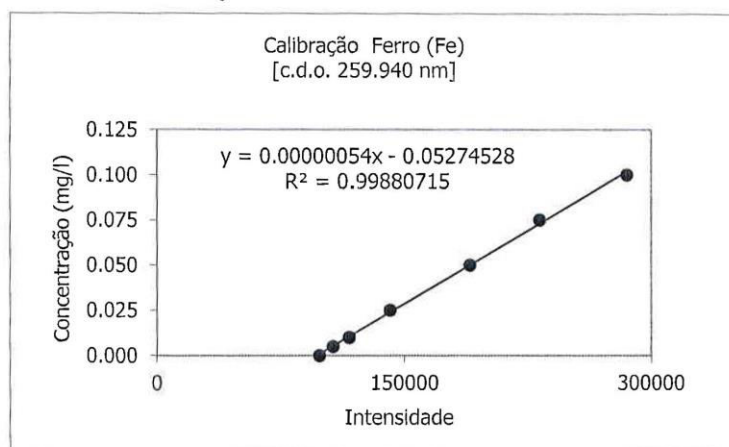


Operador: Carla Rodrigues / Lab. Análises REQUIMTE
Submetido por: Dr.^a Cristina Timóteo / Depto. Química
Responsável: Dr.^a Cristina Timóteo / Depto. Química

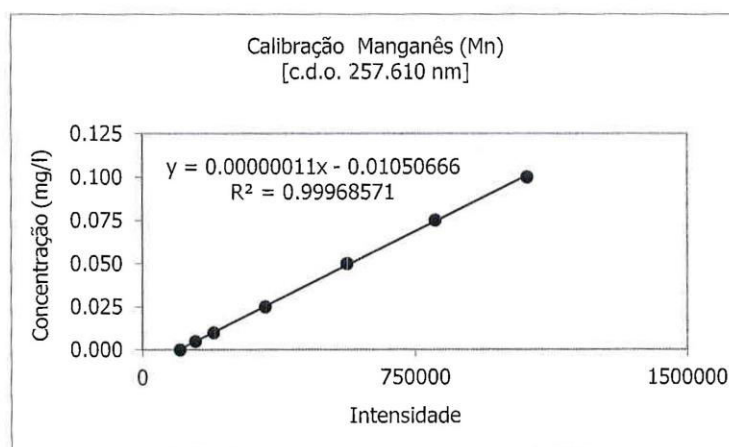
Req. Interna: 14-I091
Data Análise: 18/03/14
Tempo de análise: 30 min

Calibração

Intensidade	Conc. (mg/l)
98769	0.000
107014	0.005
116664	0.010
141144	0.025
189236	0.050
231485	0.075
284949	0.100



Intensidade	Conc. (mg/l)
103377	0.000
145777	0.005
196285	0.010
339304	0.025
563138	0.050
803305	0.075
1055482	0.100



A TÉCNICA

Carla Rodrigues

LABORATORIO DE ANALISES

Serviço de Espectroscopia de Emissão Atômica



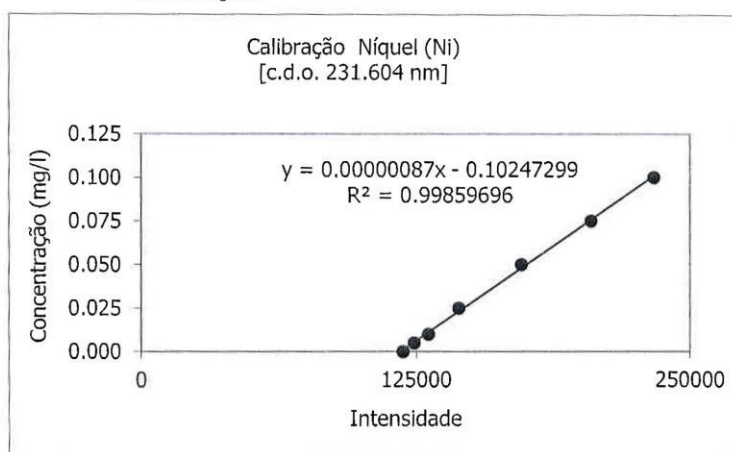
Operador: Carla Rodrigues / Lab. Análises REQUIMTE
Submetido por: Dr.^a Cristina Timóteo / Depto. Química
Responsável: Dr.^a Cristina Timóteo / Depto. Química

Req. Interna: 14-I091
Data Análise: 18/03/14
Tempo de análise: 30 min

Calibração

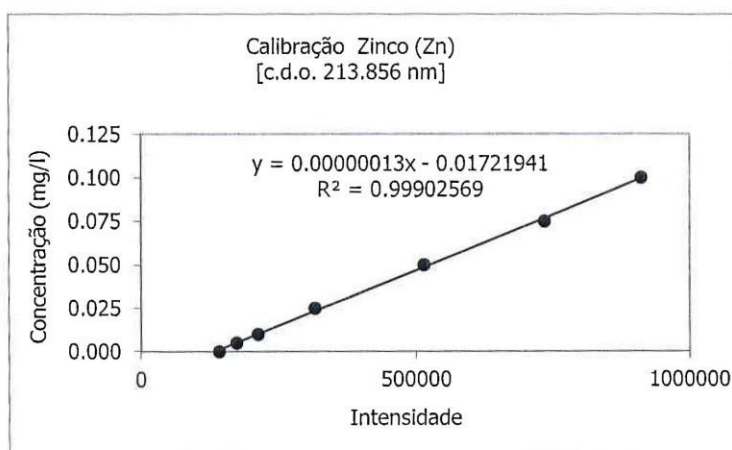
Intensidade Conc. (mg/l)

118884	0.000
123913	0.005
130387	0.010
144058	0.025
172535	0.050
204456	0.075
233399	0.100



Intensidade Conc. (mg/l)

142773	0.000
174575	0.005
213849	0.010
317360	0.025
513811	0.050
732856	0.075
910799	0.100



A TÉCNICA

Carla Rodrigues

Apêndice 11. Ensaios de ligação na presença de zinco

Efetuuou-se o um ensaio de ligação da His₆-SUMO-PerR ao DNA incubada com zinco e ferro numa proporção de 1:1 com a proteína (**Figura 11.1**).

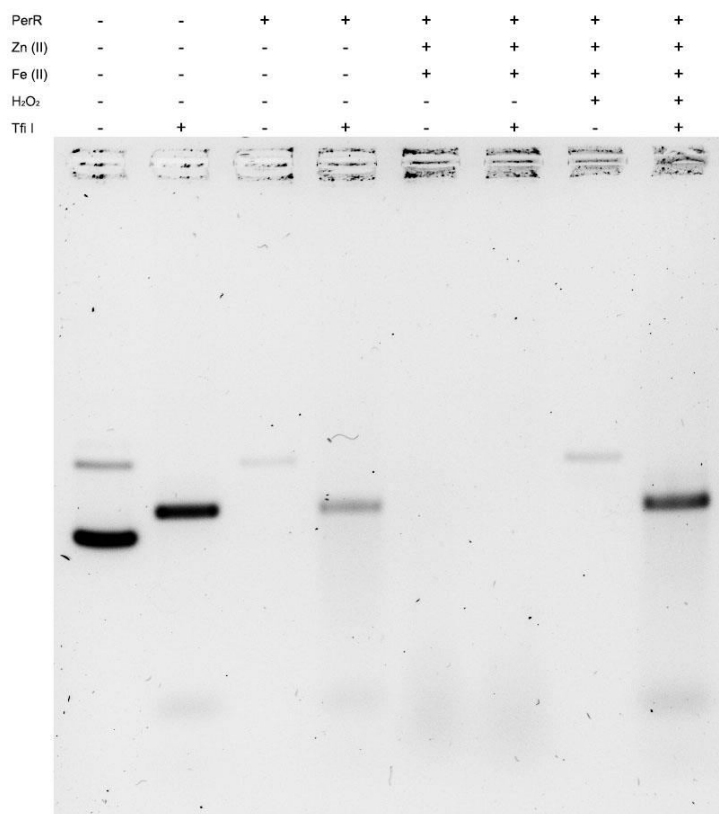


Figura 11.1 – Gel 1 % de agarose, em tampão TAE, corrido 1 h a 100 V. Ensaios de ligação na presença de ferro e zinco 1:1 com proteína, na presença e ausência de peróxido.

Neste ensaio verifica-se o mesmo resultado que no ensaio demonstrado em que só se incubou a proteína com ferro, indicando-nos que a atividade da proteína mantém-se.